

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

## **Activadores del desarrollo patológico de la cardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (ARVC)**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

**Francisco Miguel Cruz Uréndez**

Licenciado en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid.

Director de Tesis

Dr. Juan Antonio Bernal Rodríguez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares  
Instituto de Salud Carlos III







***A mis admirables padres,***

*“¡Qué extraño: ¡cuanto más  
me esfuerzo, más suerte  
tengo!”*

*Henry Ford*

---



*“Las palabras son como las hojas.  
Cuando abundan, poco fruto hay entre ellas”*

*Alexander Pope*

---



## **CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS**

Don **Juan Antonio Bernal Rodriguez**, investigador principal en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) del instituto Carlos III de Madrid, CERTIFICA que:

D. **Francisco Miguel Cruz Uréndez**, Licenciado en Bioquímica por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**ACTIVADORES DEL DESARROLLO PATOLÓGICO DE LA CARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO (ARVC)**”

y considera que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firma la presente en Madrid a 19 de Mayo del 2017

VºBº Director de la Tesis

Juan Antonio Bernal Rodriguez

---



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral y me han ayudado a crecer profesionalmente.

Quiero agradecer especialmente a mi director de tesis, Juan Bernal. No tengo palabras para describir las situaciones que han hecho de un jefe un amigo. Ninguna utopía estará tan cerca de la realidad que he vivido. Gracias por la libertad que he tenido, y el buen hacer inculcado. Eres un referente.

Al igual, agradecer a todo el laboratorio el cómodo ambiente de trabajo y toda la ayuda recibida. Sin ellos, no hubiese sido posible.

Gracias a Borja Ibáñez y a su grupo por llevar a cabo un trabajo de constancia y sacrificio para hacer posible los éxitos que juntos hemos tenido. He aprendido mucho de vosotros a lo largo de estos años, y por ello gracias.

Special thanks to Ko Sato, Eri Sato, Anna S. and Yama-pi for my stay with them in Japan. Those months were really uplifting for me. For the best moments, thanks.

Agradezco de todo corazón la confianza depositada por Antonio Bernad, por quién a día de hoy estoy aquí. Mucho he aprendido de él y espero que así siga. Gracias a Candelas Carreiro por su paciencia y empeño por verme crecer. Al igual, agradecer a todo el laboratorio por los maravillosos años que compartí con ellos. Agradecer con especial ahínco a María y Laura, con quienes he compartido mis mejores momentos.

Muchos experimentos, y muchas horas han sido las que han hecho posible este trabajo. Agradecer a María del Mar por haber conseguido amenizar ese esfuerzo y llenar de sentido mi vida.

Un agradecimiento muy especial a mis padres por todo el apoyo durante estos largos años. Habéis sido imprescindibles en todo. Gracias a vosotros soy quien soy.

A todos, gracias.

Volvería a repetir. Sin duda.

---





*RESUMEN*



Multitud de recientes avances médicos se sustentan en logros en ciencia básica que se han trasladado a la clínica gracias a diversos modelos animales de experimentación. Los avances en medicina requieren del uso de buenos modelos animales para trasladar la investigación básica a la clínica. El problema surge cuando estos modelos no están disponibles, bien porque no recapitulan a nivel fisiológico todos los aspectos de la patología humana o bien porque los modelos animales no existen, como ocurre con algunas cardiomiopatías hereditarias. Tal es el caso de la cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (ARVC), un claro ejemplo de enfermedad cardíaca con base genética con más de 380 mutaciones asociadas, y con un número limitado de modelos transgénicos capaces de distinguir mutaciones patológicas de simples variaciones genéticas normales.

En este trabajo utilizamos virus adeno-asociados (AAV), una herramienta ampliamente utilizada en terapia génica, para desarrollar, en contraste, un modelo patológico murino capaz de mimetizar un desorden genético humano. Evaluamos la contribución patológica de la versión mutante R735X de Pkp2 en el desarrollo de eventos ARVC, mediante una simple y rápida inyección intravenosa de partículas AAV. En comparación con los sistemas tradicionales de generación de modelos animales transgénicos, este método resulta mucho más versátil, barato, y simple, además de reducir el tiempo experimental y el uso de animales.

Debido a que el desarrollo de la enfermedad parece acelerarse en jóvenes atletas, y a que no se ha demostrado formalmente la asociación entre ejercicio y la patología, los ratones fueron sometidos a un protocolo de natación severa para demostrar que la expresión cardíaca de la proteína mutante R791X de Pkp2 desarrolla disfunción del ventrículo derecho. Además, demostramos una clara predisposición a sufrir eventos ARVC en portadores de la mutación durante el tratamiento con doxorubicina, un potente fármaco antineoplásico con fuertes efectos cardiotóxicos,

En resumen, desarrollamos un nuevo método con el potencial de dar soporte a otros campos de investigación, reforzando además el principio de las 3Rs a favor al uso racional de animales de experimentación. Establecemos y validamos una cardiomiopatía con herencia autosómica dominante, mediante inyección de partículas AAV en animales silvestres, y sin necesidad de generar una colonia transgénica. Demostramos que tanto ejercicio como la exposición a cardiotóxicos son potentes inductores de la enfermedad en portadores de la mutación R735X de Pkp2, corroborando que nuestro modelo cumple con las principales pautas para el diagnóstico de ARVC en humanos, y validando el modelo para futuros estudios.

---



## *SUMMARY*



To improve human health, discoveries in basic research requires preclinical testing using adequate animal models to translate them into clinics. These disease-models are not always available, like is the case for some genetic-based cardiomyopathies. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC), one of the most important causes of sudden cardiac death in young population, is a good example of a complex cardiac disease with a long list of described deleterious mutations. Even though more than 380 mutations have been described a limited number of transgenic disease models expressing mutant alleles are available to evaluate their pathological contribution.

In this work, we adapt well-accepted gene therapy tools, adeno-associated virus (AAV), initially designed for genetic diseases treatment and correction, to generate in contrast a disease mouse model that mimic a human cardiac genetic disorder.

We define both an approach and contribution to ARVC of cardiac-specific trans-expressed *Pkp2* dominant-negative mutant compared to wild type mice heart using a single systemic injection of AAV particles. This method when compared with generation of multiple transgenic mouse lines in the study of inherited autosomal dominant cardiomyopathies is more versatile, cost-effective, simpler, and reduces the experimental time frame.

Since ARVC disease penetrance is accelerated in young athletes we have included in our experimental settings an endurance swimming training protocol to demonstrate that cardiac AAV-mediated transexpression of *Pkp2* disease-causing mutant develops right ventricle dysfunction. In addition, we evaluated the predisposition to suffer ARVC events during doxorubicin treatment, a potent anticancer drug with cardiotoxic effects described. We corroborate that our transgenic-like model fulfill major task force criteria for ARVC diagnosis in humans.

In summary, our work has the potential to add value to other research fields and the general public, such as disease-modeling, cardiology and transgenesis, reinforcing the 3Rs principle in favor of the rational use of animal in experimentation. This study offers an example of a new rationale to re-focus specific gene therapy tools into an established and well validated autosomal dominant dependent cardiopathology. We demonstrate that both exercise and doxorubicin therapy are potent inducer of the disease in R735X carrier mutation, validating the model for future study, prevention or treatment.

---





# *ÍNDICE*



I-	ABREVIATURAS .....	7
II-	INTRODUCCIÓN .....	11
	1. MUERTE SÚBITA ASOCIADA A ARVC .....	13
	2. CARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO (ARVC) .....	15
	2.1 Etiología y patogenicidad .....	18
	2.1.1 Alteraciones en el sistema excitación-contracción .....	19
	2.1.2 Alteraciones de las uniones intercelulares .....	20
	2.2 Modelos animales .....	20
	2.3 Penetrancia: Activadores del desarrollo de la enfermedad .....	21
	2.3.1 Ejercicio como desencadenante de ARVC .....	21
	2.3.2 Quimioterapia como mediador de la cardiotoxicidad .....	22
	3. UN NUEVO MODELOS. UNA NUEVA HERRAMIENTA.....	23
	3.1 Virus adeno-asociados (AAV) en terapia génica .....	23
	3.2 Biología de los AAV .....	24
	3.2.1 Ciclo de vida .....	25
	3.3 Utilización de AAV para la generación de modelos animales de enfermedades .....	26
III-	OBJETIVOS .....	27
IV-	MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
	1. Diseño del estudio .....	33
	2. Procedimiento animal y protocolos de entrenamiento y tratamiento con doxorubicina .....	33
	3. Imagen por resonancia magnética cardíaca (MRI) .....	35

4. Análisis de datos de MRI .....	35
5. Electrocardiograma .....	35
6. Producción y purificación de vectores AAV .....	36
7. Determinación del título de vectores AAV .....	36
8. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) .....	37
9. Inmunofluorescencia .....	37
10. Microscopía electrónica de transmisión .....	38
11. Análisis estadísticos .....	38
 V- RESULTADOS .....	39
 1. GENERACIÓN DE MODELOS DE ARVC POR EXPRESIÓN ESPECIFICA DE TEJIDO DEL GEN <i>PLAKOPHILIN-2 (PKP2)</i> .....	41
 1.1 Construcción de vectores para generar virus adeno-asociados (AAV) .....	42
1.2 Transducción de AAV <i>in vivo</i> .....	42
1.3 Análisis de expresión .....	45
1.4 Análisis de infección y distribución del transgen .....	47
 2. ANÁLISIS DEL MODELO DE CARDIOMIOPATÍA ARRITMOGÉNICA (ARVC) .....	48
 2.1 Análisis anatómico/funcional mediante imagen por resonancia magnética (MRI) cardíaca .....	49
 3. EFECTO DEL EJERCICIO EN EL DESARROLLO DE LA ARVC .....	51
 3.1 Entrenamiento aeróbico .....	51
3.2 Efecto del entrenamiento en la función cardíaca (MRI) .....	52
3.3 Caracterización estructural de conexiones cardíacas tras ejercicio.....	54

---

---

3.3.1 Localización de placoglobina (JUP) como potencial marcador .....	56
3.3.2 Análisis de Cx43 en uniones tipo gap entre cardiomiocitos .....	57
3.3.3 Microscopía electrónica de transmisión .....	60
<b>3.4 Análisis histológico .....</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Estudio electrocardiográfico después del ejercicio .....</b>	<b>63</b>
 <b>4. CARDIOTOXICIDAD Y ARVC .....</b>	 <b>64</b>
4.1 Análisis histológico y funcional tras el tratamiento con doxorubicina .....	64
4.2 Análisis estructural de desmosomas tras el tratamiento con doxorubicina .....	66
4.3 Análisis estructural de mitocondrias tras el tratamiento con doxorubicina .....	67
 VI- DISCUSIÓN .....	 71
VII- CONCLUSIONES .....	81
VIII- BIBLIOGRAFÍA .....	85
IX- PUBLICACIONES RELACIONADAS .....	101
X- OTRAS PUBLICACIONES .....	117

---



## *ABREVIATURAS*





---

AAV = Virus adeno-asociados

ARVC= Cardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho

RMC = Resonancia Magnética cardíaca

Cx43 = Conexina 43

FE = Fracción de eyección

EGFP = Proteína fluorescente verde mejorada

Luc = Luciferasa

VD = Ventrículo derecho

VI = Ventrículo izquierdo

RNA<sub>m</sub> = Ácido ribonucleico mensajero

Pkp2 = Placofilina 2

R735X = Delección en el extremo C-terminal de Pkp2a

---



# *INTRODUCCIÓN*

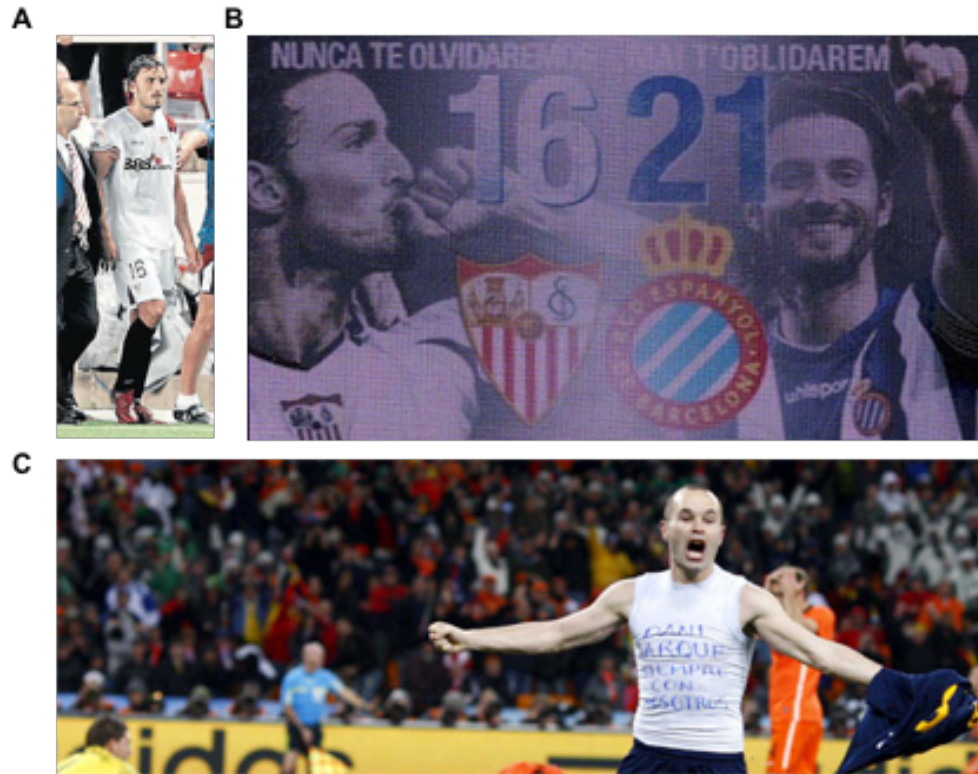


## 1. MUERTE SÚBITA ASOCIADA A ARVC

La muerte súbita cardíaca (del inglés, *Sudden cardiac death*, SCD) es la aparición repentina e inesperada de una parada cardíaca en una persona que aparentemente está sana y en buen estado. Esta parada cardíaca puede incluso resultar en la muerte. Los afectados por SCD se suelen dividir arbitrariamente en dos grupos: mayores de 40 años y menores. En los primeros, el infarto de miocardio es la causa más común de estas muertes. Entre los jóvenes existen tres tipos de enfermedades del corazón que causan la SCD: las congénitas, la miocardiopatía hipertrófica y la cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (del inglés, *Arritmogenic right ventricle cardiomyopathy*, ARVC), siendo ésta una de las principales causantes<sup>1</sup>. La incidencia de arritmias malignas en pacientes de ARVC es alta y provoca que el corazón no se contraiga de manera eficiente, disminuye el flujo sanguíneo y provoca una parada cardiorespiratoria con la consiguiente anoxia y muerte cerebral, lo que puede concluir con un fallo multiorgánico y el fallecimiento.

La patología cardiovascular no es la única pero sí la más frecuente en deportistas. Entre el 74 y el 94% de las muertes no traumáticas ocurridas durante la práctica deportiva se deben a causas cardiovasculares<sup>2-4</sup>, siendo ARVC una de las principales responsables. Debido a la importancia mediática que el deporte ejerce en la opinión pública, es lógico pensar que la repercusión social de estos eventos tiene gran calado mediático. Deportes como el fútbol han sufrido diversos episodios de SCD en los últimos años, como es el caso de Víctor Hugo Ávalos, Dani Jarque o Antonio Puerta, uno de los más impactantes en el fútbol español. Los fallecimientos de estos futbolistas conmocionaron a la opinión pública y al mundo del deporte y el recuerdo sigue presente a día de hoy (Figura 1).

Por todo ello, cabe esperar un fuerte impacto social debido a eventos de SCD, que despierte sentimientos de duda, miedo, preocupación y preguntas en relación al deporte. ¿No es seguro el deporte? ¿Cuándo debo parar? ¿Cuál es el límite? Si ARVC es una causa relativamente frecuente de SCD en jóvenes deportistas, es necesario estudios encaminados a mejorar el conocimiento del desarrollo de la enfermedad, potenciales pronóstico de las diferentes variantes mutantes y el futuro consejo a miembros de la familia con la enfermedad.



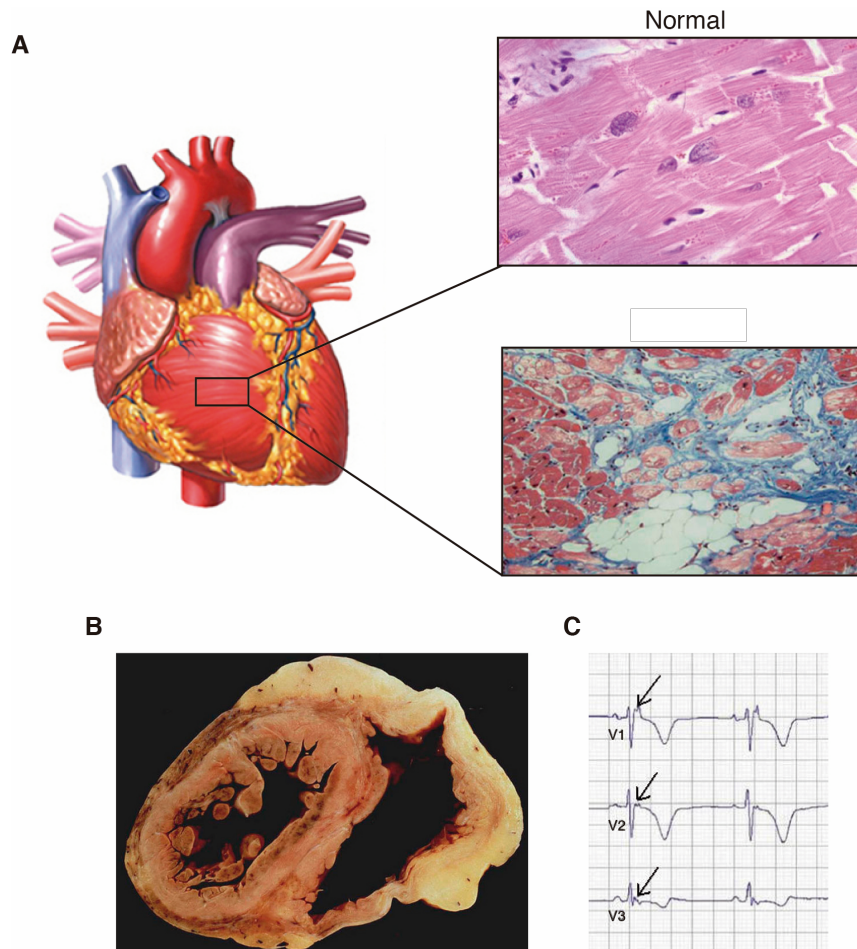
**Figura 1. Fuerte impacto mediático. A)** Antonio Puerta tras salir del campo después de perder el conocimiento durante un partido frente al Getafe. En los vestuarios perdió el conocimiento de nuevo y en el trayecto al hospital sufrió una parada cardio-respiratoria. Finalmente murió por encefalopatía post-anóxica causada por el shock cardiogénico en el que se encontraba. El diagnóstico final fue ARVC. **B)** Videomarcador conmemorativo por las muertes de Antonio Puerta, jugador del Sevilla F.C., y Dani Jarque, jugador del R.C.D. Espanol. **C)** Emotiva dedicatoria de Andrés Iniesta a Dani Jarque en la final del Mundial de futbol de 2010.

## 2. CARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO (ARVC)

La ARVC fue descrita por primera vez por el grupo de Fontaine<sup>5</sup> en el año 1977. Fontaine y colaboradores observaron una serie de anomalías en la contractilidad del ventrículo derecho y gran cantidad de tejido adiposo en pacientes sometidos a intervención por taquicardias ventriculares refractarias a diversos tratamientos médicos, y sin aparente daño en la masa muscular cardíaca. Unos años más tarde, Markus et al<sup>6</sup> publicó las primeras características clínicas de pacientes con ARVC. Desde entonces, se reconoció como una enfermedad que se debe considerar de forma sistemática en el diagnóstico diferencial en pacientes con arritmias ventriculares, especialmente si se originan en el ventrículo derecho.

De forma general, ARVC se puede definir como una enfermedad que afecta al músculo cardíaco de etiología diversa, con una prevalencia y penetrancia variable. Se estima que entre 1:2500 a 1:5000 personas sufren de esta cardiomiopatía. Clínicamente se caracteriza por anomalías anatómicas en la pared libre del ventrículo derecho, que pueden derivar en una dilatación ventricular. Estas anomalías estructurales pueden llevar asociados eventos disquinéticos, y/o arritmias de origen ventricular. En ocasiones existe un reemplazo del miocardio ventricular derecho por tejido adiposo, fibrótico o fibroadiposo<sup>7</sup>. En etapas tempranas, pacientes con ARVC pueden mostrar anomalías en el electrocardiograma sin presentar anomalías anatómicas o funcionales en el corazón<sup>8</sup>. Por ejemplo, se ha descrito que un aumento en la prolongación del segmento QRS > 110 ms en la derivación V1 es frecuente en pacientes con ARVC<sup>9,10</sup>. Las alteraciones electrocardiográficas además incluyen ondas T invertidas en las derivaciones precordiales derechas y potenciales tardíos ventriculares derechos en forma de ondas épsilon en las derivaciones V1-V3<sup>11</sup> (Figura 2).

La dificultad para identificar individuos con ARVC condujo al desarrollo de una “Task Force” para establecer unos criterios de diagnóstico<sup>12</sup> de esta patología, basados en la identificación de anomalías estructurales, sustitución del tejido miocárdico por adiposo o fibroadiposo, cambios electrocardiográficos, taquicardias ventriculares del ventrículo derecho y asociación familiar. Posteriormente, Marcus et al revisaron estos criterios de diagnóstico para optimizar e identificar mejor a pacientes de ARVC<sup>7</sup> (Tabla 1). Siguiendo esta guía se establece el diagnóstico definitivo de ARVC cuando se cumplen 2 criterios mayores, 1 criterio mayor y dos menores o 4 criterios menores de diferentes categorías.



**Figura 2. Presentación clínica de ARVC. A)** Imágenes histológicas de corazón sano (arriba; tinción de Hematoxilina-eosina) y corazón con la cardiomiopatía (abajo; tinción tricrómica), en el cual se observa infiltración grasa y fibrótica (azul) **B)** Corte transversal biventricular de un corazón con ARVC. Dilatación del ventrículo derecho con notable infiltración adiposa transmural. **C)** Electrocardiograma de un paciente con ARVC. Se observa un bloqueo de la rama derecha del haz de His, una onda epsilon (flechas), y una inversión de la onda T difusa.

El principal problema a la hora de identificar pacientes con ARVC en jóvenes es que, en ocasiones el primer síntoma es la SCD. Además, hasta la fecha, ningún tratamiento detiene o revierte la progresión de la enfermedad, y los tratamientos solo tratan los síntomas. Así, se emplean desfibriladores cardioversores implantables (ICD; de las siglas en inglés *Implantable cardioverter-defibrillator*) o tratamientos farmacológicos para reducir la incidencia de arritmias, aunque en ocasiones la única solución es el trasplante cardíaco.



**Tabla 1**  
CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO ARVC. TASK FORCE REVISADA

Criterios	Mayores	Menores
<b>Disfunción global o regional y presencia de cambios estructurales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilatación severa del VD</li> <li>- Disquinesia, aquinesia o aneurisma del VD</li> <li>- Disminución severa en la FEVD con o sin afectar el VI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilatación ligera del VD</li> <li>- Disquinesia, aquinesia o aneurisma del VD regional</li> <li>- Disminución ligera en la FEVD sin afectar al VD</li> </ul>
<b>Características histológicas de la pared ventricular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reemplazamiento de tejido miocárdico por fibrótico, adiposo o fibroadiposo</li> </ul>	
<b>Anomalías de la repolarización y despolarización</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ondas T invertidas en precordiales V1, V2 y V3</li> <li>- QRS <math>\geq 120</math> ms en <math>&gt;</math> de 14 años con ausencia de bloqueo de la rama derecha</li> <li>- Ondas épsilon en los precordiales derechos V1 a V3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ondas T invertidas en precordiales V1 y V2 en individuos <math>&gt;</math> 14 años con ausencia de bloqueo de la rama derecha; o en V4, V5 y V6</li> <li>- Ondas T invertidas en V1, V2, V3 y V4 en individuos <math>&gt;</math> 14 años con de bloqueo de la rama derecha</li> <li>- Potenciales tardíos (SAECG)</li> </ul>
<b>Arritmias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No sostenida o sostenida taquicardia ventricular tipo bloqueo de la rama izquierda (eje superior)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>&gt;</math> 500 extrasístoles ventriculares en 24 horas (Holter)</li> <li>- No sostenida o sostenida taquicardia ventricular tipo bloqueo de la rama izquierda (eje inferior) o en el outflow del VD</li> </ul>
<b>Historial familiar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ARVC confirmada en familiares de primer grado</li> <li>- Detección de mutaciones patológicas asociadas a ARVC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Historia familiar de muerte súbita en <math>&lt;</math> 35 años con sospecha de ARVC</li> <li>- Historia familiar de diagnóstico clínico basado en estos criterios</li> </ul>

Detectados por ecografía, resonancia magnética, angiografía o técnicas de electrocardiograma. VD: Ventrículo derecho; FEVD: fracción de eyección del ventrículo derecho; SAECG: Signal-Averaged Electrocardiogram

### *Implicación del ventrículo izquierdo*

ARVC es una enfermedad principalmente del VD, aunque existe muchos pacientes que tienen afectado el VI, donde existe una progresión severa de la enfermedad. Se han publicado multitud de estudios sobre la participación del VI en la enfermedad ARVC. Existen ejemplos que incluso sostienen que más del 75% de pacientes con ARVC tenían afectado VI, dependiente de la edad y asociada a acontecimientos arrítmicos, cardiomegalia severa, infiltración linfocítica e insuficiencia cardíaca<sup>13</sup>. Por otro lado, también existen estudios que describen casos de cardiomiopatía arritmogénica exclusiva de ventrículo izquierdo, con características anatomopatológicas idénticas a las del lado derecho<sup>14,15</sup>.

## **2.1 ETIOLOGÍA Y PATOGENICIDAD**

La etiología y patogenia de la ARVC ha permanecido durante mucho tiempo desconocida. Desde sus comienzos se propusieron diversas posibilidades, contemplando desde anomalías del desarrollo con atrofia miocárdica progresiva<sup>12</sup>, hasta que el desencadenante fuese un componente genético, lo que encajaría con la existencia de formas familiares<sup>16</sup>, con genes afectados que podrían heredarse de forma autosómica dominante. En este sentido, los estudios de Rampazzo et al. en 1994 fueron los primeros en desvelar un componente genético en esta enfermedad al estudiar 4 generaciones con 19 afectados<sup>17</sup>. Estos pacientes portaban el gen responsable en el cromosoma 14 loci 14q23-q24. Unos años más tarde, nuevos locis aparecieron como posibles portadores de los genes responsables, uno en el cromosoma 14 (14q12-q22)<sup>18</sup>, y otro en el cromosoma 1 (1q42- q43)<sup>19</sup>. Hasta la fecha, han sido identificados 10 genes como responsables de la ARVC<sup>20</sup>, lo que hace de esta enfermedad un paradigma de enfermedad cardíaca compleja de herencia autosómica dominante<sup>20-23</sup>. El gen afectado condiciona su clasificación y fenotipo (Tabla 2)<sup>1</sup>.

---

**Tabla 2**  
CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS AFECTADAS.  
VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ARVC

Designación/tipo	Cromosoma/locus	Gen
ARVC 1	14q23-q24	TGFβ3
ARVC 2	1q42-q43	RyR2
ARVC 3	14q12-q22	No identificado
ARVC 4	2q32.1-q32.3	TTN
ARVC 5	3p23	TMEM43
ARVC 6	10p12-p14	No identificado
ARVC 7	10q22	No identificado
ARVC 8	6p24	DSP
ARVC 9	12p11	PKP-2
ARVC 10	18q12.1	DSG-2
ARVC 11	18q12.1	DSC-2
ARVC 12	17q21	JUP
TGFβ3, factor de crecimiento transformante β3; RyR2, receptor cardíaco de la rianodina; TTN, titina; TMEM43, proteína transmembrana 43; DSP, desmoplaquina; PKP-2, placofilina-2; DSG-2, desmogleína-2; DSC-2, desmocolina-2; JUP, placoglobina		

### **Alteraciones en el sistema de excitación-contracción**

La homeostasis del calcio es vital para mantener el funcionamiento correcto del sistema excitación-contracción en cardiomiocitos. Diversas proteínas regulan estos procesos como, por ejemplo, el receptor cardíaco de la rianodina (RYR2), un regulador de los canales de calcio en el retículo endoplasmático. Distintas mutaciones en el gen *RYR2* se asocian a ARVC<sup>24-29</sup>. En mutantes de *RYR2* la concentración citosólica de calcio podría aumentar, desencadenando la muerte celular programada<sup>26-28</sup>, además de un desacoplamiento en el proceso de excitación-contracción que daría lugar a arritmias. De igual manera, mutaciones en el factor de crecimiento transformador β-3 (*TGFβ3*)<sup>29</sup> modula la expresión de las proteínas de contacto celular con *RYR2*.

Otros ejemplos se han descritos recientemente para el gen de la proteína transmembrana 43 (*TMEM43*), que causa una variante de ARVC de penetración completa y muy letal (ARVC tipo 5)<sup>30</sup>, o mutaciones en el gen de la Laminina A/C (*LMNA*)<sup>31</sup>, titina (*TTN*)<sup>32</sup>, o desmina (*DES*)<sup>33</sup>, también responsables de fenotipos ARVC.

### Alteraciones de las uniones intercelulares

Uno de los mecanismos potenciales descrito para explicar el origen de la ARVC se basa en la observación de alteraciones estructurales<sup>34</sup> en las interconexiones entre cardiomiocitos de muestras de pacientes. Los desmosomas son una clase de uniones focales responsable de fuertes uniones intercelulares tanto en músculo cardíaco como uniones epidérmicas<sup>35,36</sup>. Están compuestos de diversas proteínas que forman un importante complejo proteico que desempeña un papel clave en la transducción de la comunicación intracelular y el estrés mecánico. Están compuestos por una placa citoplasmática densa que actúa de anclaje entre los filamentos intermedios de queratina y las proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas. La placa citoplasmática densa está compuesta por desmoplaquina (*DSP*), que une directamente con los filamentos intermedios y con las proteínas placoglobina (*JUP*) y placofilina-2 (*PKP2*), encargadas de unir con las cadherinas transmembrana desmogleína-2 (*DSG2*) y desmocolina-2 (*DSC2*), asegurando la adhesión mecánica entre célula y célula.

De los 10 genes que se asocian al desarrollo de la enfermedad, 5 de ellos codifican para proteínas desmosómicas, superando más del 50% de los pacientes con ARVC<sup>20,21</sup>. Se han identificado más de 380 mutaciones en estos genes en pacientes de ARVC, incluyendo 161 variantes potencialmente patogénicas para la proteína desmosomal PKP2. Anomalías en otras proteínas del desmosoma como *DSP*, *JUP*, *DSG2* o *DSC2* aparecen con mucha menor incidencia<sup>37-39</sup>. Por otro lado, la prevalencia en mutaciones en *PKP2* como causante de ARVC es mayor del 40%<sup>40-42</sup> en personas que sufren la enfermedad. Es por ello, que se ha propuesto que PKP2 podría funcionar como un potencial marcador de ARVC<sup>43</sup>.

## 2.2 MODELOS ANIMALES

A día de hoy existen pocos modelos animales que permitan estudiar esta enfermedad, aunque se hayan descrito multitud de mutaciones potencialmente patológicas en 10 genes asociados a familias con ARVC. Actualmente, existen algunos modelos que han permitido esclarecer el papel de estos genes en el desarrollo embrionario, así como en algunos aspectos del desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, animales con una delección completa (KO; KnockOut) del gen *PKP2* son embrionarios letales ya que son incapaces de ensamblar el tubo cardíaco durante el desarrollo embrionario<sup>44</sup>. En cambio, animales heretocigotos (haploinsuficiencia) sobreviven, aunque desarrollan características similares a los de pacientes con ARVC<sup>45</sup>. De manera similar ocurre con el modelo global KO de *DSG2*, también letal durante el desarrollo embrionario. En cambio, si la delección es específica de tejido cardíaco, desarrollan características de ARVC en adulto, como

---

dilatación del ventrículo derecho, aparición de fibrosis y defectos en la conducción eléctrica mediados por la deslocalización de la proteína conexina 43 (Cx43)<sup>46</sup>. Otros modelos KO para *JUP* también resultan en un desarrollo progresivo de la enfermedad similar al que se produce en pacientes<sup>47</sup>. En cambio, solamente la edad y el ejercicio ponen de manifiesto la enfermedad en un modelo de haploinsuficiencia para *JUP*, cursando sin sufrir reemplazamiento de la masa miocárdica por fibrosos y/o tejido fibroadiposo<sup>48</sup>.

Es importante resaltar, que ninguno de los modelos permite evaluar la patología en un escenario de dominancia negativa, donde uno de los alelos es defectuoso e interfiere con la acción del alelo silvestre. A pesar de la elevada prevalencia de mutaciones en *PKP2* que encontramos en pacientes (mayor del 40% en algunas series de pacientes y con más de 160 variantes descritas), no existen animales transgénicos que expresen alelos mutantes de la proteína humana que permitan estudiar la contribución patológica de las diferentes variantes<sup>49</sup>. A día de hoy, resulta costoso desarrollar una plataforma capaz de distinguir variantes no patológicas (SNPs) de aquellas que pueden tener importancia en el desarrollo de la enfermedad.

### 2.3 PENETRANCIA: Activadores del desarrollo de la enfermedad

Existen distintas causas que pueden inducir o acelerar el desarrollo de una cardiomiopatía. Hay multitud de versiones mutantes de cada una de las proteínas del complejo desmosomal (5 proteínas) y factores ambientales que aceleran el desarrollo o penetrancia de la ARVC. Cabe esperar que el tipo de mutación y el grado de disposición a estos factores condicionen el desarrollo de la patología. Por esta razón, es imprescindible identificar factores que disparen la aparición de los síntomas y el desarrollo de la enfermedad.

#### *Ejercicio como desencadenante de ARVC*

Los nutrientes y oxígeno que el cuerpo precisa durante el ejercicio provocan que el corazón incremente su actividad para bombear más sangre. En condiciones normales el corazón es capaz de abastecer las necesidades del organismo, pero en ocasiones, el estrés mecánico y/o metabólico generado en el órgano puede disparar el desarrollo de ARVC. Desde hace años, se conoce la estrecha relación que existe entre la SCD asociada a ARVC y el ejercicio<sup>50</sup>, en la cual la incidencia de ARVC como causa de SCD es del 20% en menores de 35 años, con un claro componente familiar. Así, parece claro que el ejercicio de alto nivel es un potente acelerador de la enfermedad en humanos<sup>51</sup>, así como en un modelo animal haploinsuficiente para *JUP*<sup>42</sup>. No

obstante, esta asociación no ha sido demostrada formalmente en animales que expresen una forma mutada de ninguna de las proteínas del complejo desmosomal.

### ***Quimioterapia como mediador de la cardiotoxicidad***

El efecto cardiotóxico de algunos fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento contra el cáncer es bien conocido desde hace años, ya que son, capaces de generar suficiente estrés como para desarrollar una cardiomiopatía en individuos sanos<sup>52-54</sup>. Estos fármacos provocan daños a nivel celular que desembocan en una cardiomiopatía degenerativa que puede evolucionar hasta una insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), e incluso arritmias. Antraciclinas, Trastuzumab, Ciclofosfamida, Sunitinib, o Lapatinib son algunos de los ejemplos de antitumorales que pueden inducir cardiomiopatía como efecto secundario. Dentro del grupo de las antraciclinas la epirrubicina, idarrubicina, daunorrubicina y doxorrubicina, se siguen utilizando en clínica. Una de las más usadas históricamente que inducen cardiotoxicidad ha sido la doxorrubicina<sup>55-59</sup> (Dox), que ejerce su actividad antitumoral por la inhibición de la Topoisomerasa II, esencial para la maquinaria de reparación y replicación del DNA<sup>60,61</sup>. No obstante, existen daños secundarios asociados al tratamiento que se producen específicamente sobre el corazón, de manera dosis dependiente, provocado por estrés metabólico. Durante el tratamiento se generan radicales libres<sup>62,63</sup>, se activan rutas pro-apoptóticas y necrosis lo que termina con el desarrollo de fibrosis<sup>64-66</sup>, aumenta la peroxidación lipídica<sup>67</sup> y se daña el ADN mitocondrial<sup>68,69</sup>. Recientemente se ha propuesto que la Dox genera una acumulación de iones de hierro en el interior de la mitocondria que genera la cardiotoxicidad general que se observa<sup>56,70</sup>. y la muerte del cardiomiocito. Una de las hipótesis del origen de ARVC es que el desarrollo de la enfermedad se inicia por la muerte del cardiomiocito. Conocer si la predisposición genética a ARVC también afecta a la respuesta de estos pacientes a compuestos cardiotóxicos es relevante e importante a la hora de decidir los tratamientos más adecuados. A pesar de las importantes implicaciones clínicas, no existen estudios que combinen estos elementos.

---

### 3. UN NUEVO MODELO. UNA NUEVA HERRAMIENTA

El estudio de enfermedades genéticas con muchas variantes requiere de una plataforma que permitan analizar las distintas versiones mutantes de genes e identificar los factores clave que predisponen a la patología. Actualmente mediante transgenesis se pueden generar animales genéticamente modificados, aunque requiere un alto costo, técnicas y personal especializado no al alcance de todos. A pesar de ser efectiva, ni las técnicas más avanzadas permiten al usuario evitar un proceso largo y costoso. Este hecho destaca la necesidad de incorporar nuevas herramientas que permitan disponer de estos modelos sin la dificultad, el coste y el tiempo que requiere la generación de las colonias de animales transgénicos.

#### 3.1 VIRUS ADENO ASOCIADOS (AAV) EN TERÁPIA GÉNICA

Durante la última década, la terapia génica se ha centrado en la búsqueda de vectores capaces de transducir genes de manera eficiente, y de manera específica cualquier tipo celular, para expresar el transgen de forma permanente. Una de las características más importantes que deben tener estos vectores es que deben ser seguros e inocuos para los pacientes, y no deben desencadenar una respuesta inmune. En las últimas décadas se han usado diferentes tipos de vectores víricos en terapia génica, tales como retrovirus, adenovirus o virus adeno-asociados, cada uno con características y ventajas particulares (tabla 3).

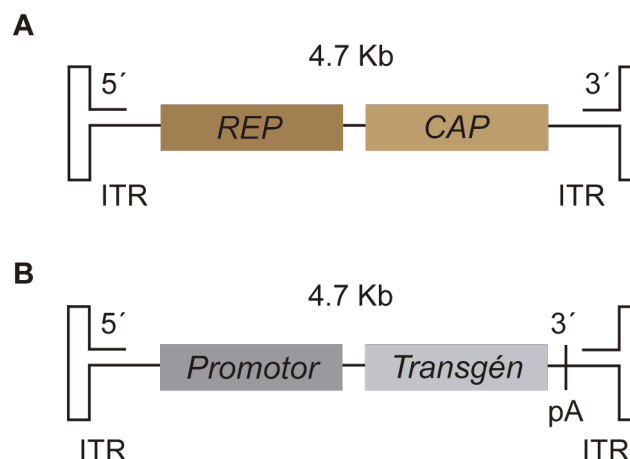
**Tabla 3**  
CARACTERISTICAS DE VECTORES BIOLOGICOS  
UTILIZADOS EN TERAPIA GENICA

VECTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>AAV</b>	Transducción en gran variedad de células en división y post-mitóticas Expresión permanente Evade respuesta inmune	Tamaño limitado del transgen Producción limitada
<b>Adenovirus</b>	No integrativos Tamaños grandes del transgen Elevada eficiencia de transducción	Alta respuesta inmune Expresión temporal Fuerte tropismo preferente a hígado Transducen solo células en división
<b>Retrovirus</b>	Tamaños grandes del transgen Expresión estable Producción elevada	Transducen solo en células en división Se integra aleatoriamente

En los últimos años los vectores AAV han sido los más utilizados en terapia génica. Los AAV reciben este nombre porque se encuentran en células infectadas por adenovirus. A diferencia de los retrovirus y adenovirus, los adeno-asociados no estimulan la inflamación en la célula huésped, presentan una expresión prolongada del transgen y son capaces de transducir tanto células en división como post-mitóticas<sup>71</sup>. Los AAV se han convertido así, en el vehículo de suministro de genes preferente para tratar algunas enfermedades recesivas en el sistema nervioso o tejido muscular entre otras, con resultados satisfactorios en ensayos clínicos.

### 3.2 BIOLOGÍA DE AAV

Los AAV constituyen un grupo de virus de ADN de vertebrados pertenecientes a la familia *Parvoviridae* y del género *Dependovirus*. Son virus desnudos, sin envuelta, con estructura esférica y un tamaño de 20-30 nm. La asociación de los AAV con adenovirus se debe al hecho de que son defectuosos en replicación, y dependen de un virus colaborador (un adenovirus o un herpes virus) que le proporcione las proteínas necesarias. En ausencia de un virus colaborador, los AAV permanecen de forma latente en la célula. Se componen de tres proteínas, denominadas proteínas del virión (VP) 1, 2 y 3. Su genoma (Figura 3A) está compuesto por una cadena sencilla de ADN de unos 4.680 nucleótidos de longitud, de polaridad negativa y con secuencias repetidas invertidas en los extremos. Se trata de un genoma muy sencillo que solamente codifica para dos genes: *REP* y *CAP*<sup>72</sup>.



**Figura 3. A)** El genoma del AAV codifica para dos genes: *REP* y *CAP*, flanqueado por los ITRs. **B)** AAV recombinante.



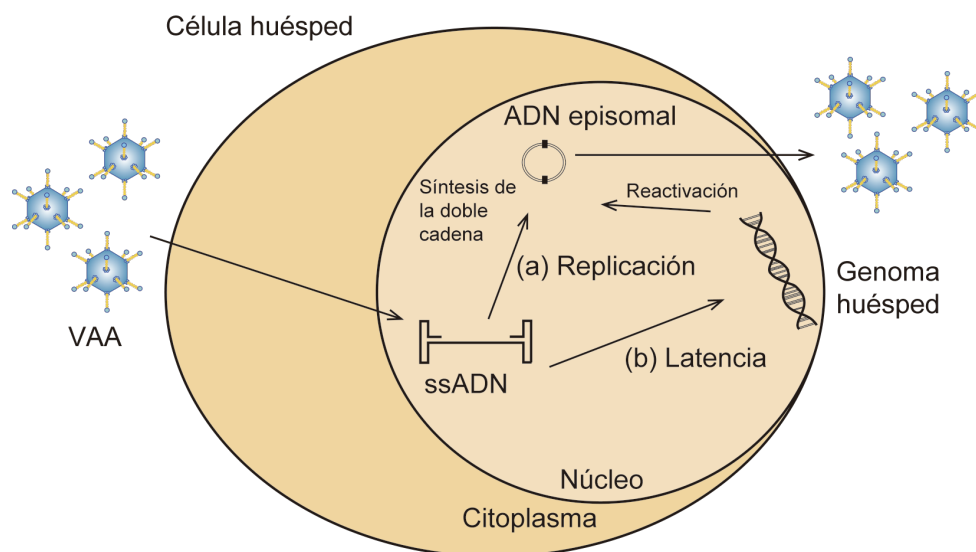
El gen *REP* (replicación) codifica con un marco de lectura abierta para varias proteínas, Rep50, Rep52, Rep68 y Rep78, involucradas en la transcripción y replicación del genoma<sup>73</sup>. El gen *CAP* (cápside) codifica para las proteínas que conformarán la cápside del virión, llamadas VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas serán las responsables de las interacciones con receptores y correceptores celulares para la internalización a través de una endocitosis mediada por receptores y para el transporte del virión al núcleo celular<sup>74</sup>. El genoma del AAV está flanqueado por dos secuencias terminales llamadas ITRs (inverted terminal repeat) de 145 nucleótidos, de los cuales 125 forman una estructura secundaria de horquilla tipo “T” debido a la secuencia palindrómica que posee. Los ITRs funcionan como *primers* o cebadores para la replicación del ADN y la formación de la doble cadena, además de mantener la integridad de los extremos. Estas regiones contienen también las secuencias que le permitirán la recombinación con el ADN huésped<sup>75</sup>. Los AAV no contiene proteínas de envoltura y su ADN solamente se encuentra rodeado por las proteínas de la cápsida (VP). Cuando se usan como vectores de transferencia genética, estos genes se sustituyen por un promotor y el transgén de interés (Figura 3B). Esta construcción suele tener un tamaño máximo de 4.7 Kb y mínima de 1 Kb para que las partículas virales se empaqueten de manera eficiente entre las secuencias ITR necesarias para el empaquetamiento.

Las diferencias antigénicas de las proteínas de la cápsida dan lugar a los distintos serotipos encontrados para este tipo de virus. Hasta la fecha, el serotipo 2 (AAV2) ha sido el que más se ha desarrollado en la terapia génica. No obstante, diversos estudios muestran que los distintos serotipos resultan en tropismos preferenciales hacia determinados tejidos<sup>76</sup>. Por ejemplo, en el tejido neural el AAV2 transduce exclusivamente neuronas, el AAV5 transduce tanto neuronas como astrocitos, mientras que el AAV4 solo transduce células del epéndimo<sup>77,78</sup>. Estudios realizados por el Dr. French BA muestran como el AAV9 resultan preferentes para el tejido cardíaco<sup>79</sup>.

### Ciclo de vida

El ciclo vital de los AAV comprende dos posibilidades: estado de latencia o estado de replicación (Figura 4). Cuando las condiciones son favorables (coinfección celular con un adenovirus o herpes virus) se genera la doble cadena y el ciclo lítico, aprovechando la maquinaria de la célula huésped para la generación de la progenie. En éste estado el genoma puede quedar de forma episomal como estructura de concatámero y expresar sus proteínas para la generación de nuevas partículas infectivas (viriones).

En el estado de latencia, el genoma del AAV puede integrarse en el genoma huésped (preferentemente en el cromosoma 19 de humanos) hasta una reactivación posterior



**Figura 4.** El ciclo viral de un adeno-asociado comprende dos estados, replicación o latencia. (a) Después de la liberación del ADN de cadena simple (ssADN, del inglés singles strain DNA) se lleva a cabo la síntesis de la doble cadena, que queda en forma episomal como estructura de concatámero. (b) El AAV pasa a integrarse en el genoma de la célula huésped y queda en un estado de latencia hasta que una infección por un adenovirus o herpes virus activan al adenoasociado llevándolo a un estado de replicación.

### 3.3 UTILIZACIÓN DE AAV PARA LA GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES

Hasta la fecha, se han publicado pocos estudios donde se emplean los AAV para generar modelos animales. Esta estrategia para obtener modelos de ratón cuando las proteínas a estudiar funcionan potencialmente como dominante negativo, se basa en la expresión de un transgen “patológico” en un fondo genético silvestre para inducir la patología. Un ejemplo de enfermedades genéticas que actúan en un marco de dominancia negativa lo encontramos en pacientes con mutaciones en la proteína PCSK9. La presencia del transgen mutante es suficiente para desarrollar hiperlipidemia, incrementando el riesgo de sufrir problemas cardiovasculares como aterosclerosis. Estudios recientes muestran que es posible generar un modelo de hiperlipidemia y pro-aterogénia mediante la transducción de AAV expresando la proteína humana mutante PCSK9 en ratones sanos<sup>80,81</sup>. Esta aproximación permite desarrollar un modelo de enfermedad humana de forma rápida, fácil y económica. Estos estudios son el “*proof of concept*” para utilizar AAV en la generación de modelos animales de cardiomiopatía compleja en un contexto genético de dominancia negativa.

## *OBJETIVOS*



---

Los objetivos de esta tesis son:

- Desarrollar un modelo de cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (ARVC) expresando en corazón una versión hipomórfica del gen plakophilin-2 (PKP2) asociada a la enfermedad.
- Testar si mutaciones ligadas al desarrollo de la enfermedad funcionan como dominante-negativo.
- Comprobar y caracterizar como factores ambientales pueden afectar al desarrollo de la patología ARVC (ejercicio extremo, o cardiotóxicos)



# *MATERIALES Y MÉTODOS*





## Diseño del estudio

Animales silvestres de entre 4 a 6 semanas de la cepa C57BL6/J fueron inyectados con  $3.5 \times 10^{10}$  genomas virales (gv) codificando Luc, la versión Silvestre humana del gen Pkp2, o la versión truncada en el extremo C-Terminal R735X. Los animales fueron divididos en tres grupos: grupo A = sedentario, grupo B = entrenados y grupo C = tratados con doxorubicina. Animales del grupo A fueron analizados por resonancia magnética cardíaca (RMC) a los 6 y 10 meses post-infección con partículas AAV. Animales del grupo B comenzaron el entrenamiento 2 semanas post-infección, durante 8 semanas consecutivas. Al final del periodo de ejercicio fueron analizados por RMC y sacrificados para la obtención de los tejidos. Animales del grupo C comenzaron el tratamiento 2 semanas post-infección, con una duración de 2 semanas alternadas y una dosis acumulada de doxorubicina de 20 mg/Kg animal. Tras este periodo, los animales fueron sacrificados para su posterior análisis.

## Procedimiento animal y protocolos de entrenamiento y tratamiento con doxorubicina

Todos los animales se mantuvieron de acuerdo a las recomendaciones del Comité Ético Institucional del CNC.

Animales silvestres de entre 4 a 6 semanas de la cepa C57BL6/J fueron obtenidos de los Laboratorios Charles River, y guardados en jaulas a temperatura controlada ( $22 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ), con una humedad relativa del  $55 \pm 10\%$ , y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Todos los animales tuvieron acceso libre a comida y agua.

Todos los animales fueron previamente adaptados a las 8 semanas de entrenamiento. La adaptación consistía en mantener a los animales en aguas poco profundas a una temperatura de  $30\text{--}32^\circ\text{C}$ , con el fin de reducir el estrés ambiental sin promover las adaptaciones de entrenamiento físico. El entrenamiento se realizó durante la fase de oscuridad del ciclo, coincidiendo con el período de máxima actividad de los animales. La intensidad del entrenamiento fue incrementando gradualmente. Los animales nadaron en agua con una profundidad de 25 cm en contenedores de cristal ( $60 \times 30 \times 45$  cm) a una temperatura de  $30\text{--}32^\circ\text{C}$ . Durante las dos primeras semanas, los animales fueron familiarizándose con el ambiente natatorio incrementando progresivamente las sesiones 5 minutos cada día, llegando a 45 minutos por día al final de la segunda semana. La duración del entrenamiento fue entonces incrementada 15 minutos por semana, hasta los 90

minutos por día en las 3 últimas semanas (Tabla 4). Todos los animales nadaron libremente, y el agua fue suavemente burbujeada para asegurar el ejercicio evitando la flotación.

Análisis aleatorio de la distancia nada reveló una distribución tipo Gausiana con un de variación del 8,4% (Figura R7), confirmando un entrenamiento homogéneo entre todos los grupos.

**Tabla 4**  
TABLA DE ENTRANAMIENTO NATATORIO

	Minutos						
<b>Semana</b> <b>1</b>	5	10	15	20	25	0	0
<b>Semana</b> <b>2</b>	25	30	35	40	45	0	0
<b>Semana</b> <b>3</b>	45	45	45	45	45	0	0
<b>Semana</b> <b>4</b>	60	60	60	60	60	0	0
<b>Semana</b> <b>5</b>	75	75	75	75	75	0	0
<b>Semana</b> <b>6</b>	90	90	90	90	90	0	0
<b>Semana</b> <b>7</b>	90	90	90	90	90	0	0
<b>Semana</b> <b>8</b>	90	90	90	90	90	<b>FIN</b>	

Los animales del grupo C fueron tratados con doxorubicina tras dos semanas de infección con partículas AAV. La dosis utilizada en esta tesis es de 2 mg/Kg al día, un total de 10 días, administrados en dos semanas alternadas vía intraperitoneal. Para evitar inflamación del tejido local se inyectó la droga por diferentes sitios de la cavidad abdominal.

## Imagen por resonancia magnética cardíaca (MRI)

Durante la evaluación por RMC, los animales fueron anestesiados con isoflurano y monitorizados para la temperatura corporal, ritmo cardíaco y ritmo respiratorio usando un sistema de monitorización compatible con la RMC.

Las imágenes *in vivo* de los corazones de los animales fueron adquiridas mediante un sistema Agilent VNMRS DD1 7T MRI (Santa Clara, California, USA). Después de la optimización, se utilizó la adquisición de imágenes de cuatro cámaras y de las dos cámaras de la parte izquierda para planificar las secuencias de eje corto. Las imágenes fueron adquiridas con los siguientes parámetros: número de segmentos, 13; grosor del segmento, 0,8 mm; huecos intermedios, 0 mm; tamaño de la matriz, 256x256; campo de visión, 30x30 mm<sup>2</sup>; ventana de grabado: desencadenado con el ECG y frecuencia respiratoria; fase cardíaca, 20; promedios, 4; TE efectivo, ~1.8 ms, TR mínimo, 7 ms; ángulo de giro, 25°; retardo en la activación, 2 ms; ventana de disparo, 8 ms; escaneos ficticios, 2.

## Análisis de datos de MRI

Todas las imágenes fueron analizadas usando un específico software (QMass MR v.7.5, Medis, Leiden, The Netherlands). El análisis fue realizado por dos observadores especializados sin saber la asignación de cada animal. Todas las imágenes fueron de buena calidad y pudieron ser analizadas. El set de datos de eje corto fue analizado cuantitativamente mediante detección manual de los bordes endocardiales al final de la sístole y al final de la diástole, con exclusión de los músculos papilares y trabeculares para obtener tanto los volúmenes diastólicos y sistólicos como las fracciones de eyección. El ventrículo derecho fue medido cualitativamente evaluando la capacidad de motilidad de la pared ventricular en imágenes modo cine tanto en el eje corto (transversal) como el eje largo (longitudinal). En ventrículo derecho fue dividido en 11 segmentos para su análisis<sup>82,83</sup>. La motilidad de la pared fue clasificada como anormal en presencia de eventos aquinéticos, disquinéticos (en sístole ventricular), o abultamientos (en diástole ventricular).

## Electrocardiograma

Los animales fueron anestesiados usando isoflurano inhalado (0.8-1.0% volumen en oxígeno). La eficacia de la anestesia fue monitorizada por la velocidad de latido. 4 derivadas superficiales de ECG fueron grabadas por un periodo de 5 minutos, usando electrodos subcutáneos de calibre 23G colocados en cada extremidad del animal y unidos a un sistema amplificador MP36R

(BIOPAC Systems). Se utilizó la derivada II para el análisis de la duración del segmento QRS usando el software de análisis AcqKnowledge 4.1. Se realizó la media de un segmento representativo de 30 segundos de la grabación para obtener la duración del segmento QRS. Esta duración se midió como el intervalo de tiempo entre el primer momento de la desviación de la línea de base y el momento en que la onda S volvió a la línea isoeletrica. La duración de los segmentos QRS de animales entrenados infectados con la versión mutante R735X fueron comparados con el conjunto de animales infectados con las versiones luc y silvestre del gen Pkp2 juntas. Al igual, animales sedentarios AAV-R735X de 10 meses fueron comparados con el conjunto de controles sedentarios.

### Producción y purificación de vectores AAV

Todos los vectores fueron producidos mediante la triple transfección, usando la línea celular HEK 293A como se describe previamente<sup>84</sup>. Los plásmidos pAAV fueron clonados y amplificados en bacterias *E. Coli* de la cepa Stbl3 (Life Technologies). Los plásmidos pAAV-PKP2, pAAV-R735X y pAAV-Luc derivaron del plasmido pAcTnT (decido por cortesía del Dr. B.A. French) y se empaquetaron en capsidas de serotipo tipo 9 usando los plásmidos auxiliares pAdDF6 (proporcionando los tres genes auxiliares adenovirales) y pAAV2 / 9 (que proporciona rep y cap genes virales), obtenidos de la compañía PennVector. Los plásmidos fueron generados por clonaje directo (GeneScript) de fragmentos sintetizados con cortes para las enzimas de restricción NheI-Sall introducidos en el pAcTnT con las mismas enzimas de restricción.

Los plásmidos se transfectaron junto con los auxiliares en la línea celular HEK 293A mediante coprecipitación por fosfato cálcico. Se utilizó un total de 840 µg de ADN (mezclados en una relación equimolar) por hiperflask (Corning), sembrado con un total de  $1.2 \times 10^8$  células el día anterior a la transfección. 72 horas después de la transfección, las células se recogieron mediante centrifugación, y el sedimento celular fue resuspendido en TMS (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 2 mM Cl<sub>2</sub>Mg) en hielo antes de la digestión con Dnasal y RNasaA (0,1 mg / ml de cada uno; Roche) a 37°C durante 1 hora. El sobrenadante clarificado con las partículas virales se obtuvo mediante un gradiente de iodixanol tal y como se describe<sup>85</sup>. Las fracciones con las partículas virales se concentraron usando columnas Amicon Ultracel (Millipore) y almacenadas a -80°C

### Determinación del título de vectores AAV

El título de los vectores AAV (gv por ml) fue determinado mediante PCR cuantitativa a tiempo real como se describe previamente<sup>86</sup>, usando los cebadores mostrados en el siguiente apartado. Conocidas cantidades ( $10^5$ – $10^8$ ) de los respectivos plásmidos (pAAV-PKP2, pAAV-R735X and

---

pAAV-Luc) fueron utilizadas para construir la curva estándar.

### PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para el análisis del tejido de ratón, RNA mensajero total fue aislado de los corazones de ratón e hígado usando Direct-zol RNA Miniprep Kit (Zymo), seguido de una retrotranscripción mediante High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). ADN complementario generado fue analizado mediante PCR cuantitativa usando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La detección de las amplificaciones y el análisis de datos se realizó mediante un sistema de detección ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System. Los datos de amplificación para cada RNA mensajero fueron normalizados con la expresión del gen endógeno GADPH. Cambios en la expresión del RNA mensajero ha sido expresado mediante incremento relativo respecto a los controles. Los cebadores usados son los siguientes:

GapdhF, 5'	TTGATGGCAACAATCTCCAC 3'	
GapdhR, 5'	CGTCCCGTAGACAAAATGGT 3'	
Pkp2 F, 5'	CAGAACAGGGCTTCCAGGTC 3'	F: Forward
Pkp2R, 5'	CTGCTCGCTCCAGAGTCATC3'	R: Reverse
eGFPF,5'	AGCTGGACGGCGACGTAAAC 3'	
eGFPR 5'	AAGATGGTGCGCTCCTGGAC 3'	

### Inmunofluorescencia

Al final del entrenamiento natatorio, se procedió a la extracción del corazón y su fijación en para formaldehído al 2% en PBS durante 1 hora a 4°C. Después de 3 lavados consecutivos de 5 minutos en PBS, los corazones fueron equilibrados en una solución de sacarosa al 15% por una hora seguido de una incubación al 30% durante toda la noche a 4°C. Las muestras fueron incluidas en OCT (Tissue-tek OCT compound, Sakura-4583), y criosecciones de 5 µm fueron preparadas para inmunofluorescencia. Los tejidos fueron permeabilizados con PBS-0.2% Tritón (Sigma, T9284) durante 10 minutos y lavados con PBS-0,1% Tritón (PBST). Los tejidos se bloquearon con una solución de suero de cabra al 10% en PBST durante 1 hora. Los tejidos fueron incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios frente a la proteína sarcomérica alfa-actinina (A7732, Sigma), Cx43 (C6219, Sigma), Tom20 (ab56783, Abcam), y EGFP (632592, Clonthech) diluidos en PBST. Después de 3 lavados en PBST, los tejidos fueron incubados con anticuerpos secundarios de cabra frente a ratón conjugados con Cy3 o Alexa Fluor 488 durante 45 minutos a temperatura ambiente y en presencia de DAPI. Seguido de 3 lavados

con PBT, las muestras fueron montadas con medio Vectashield sin DAPI (Vectors Lab.; H-1000). Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio confocal invertido Nikon A1-R. El porcentaje de células positivas en el área total del tejido fue calculado usando ImageJ después de la segmentación y medida de la intensidad de señal.

### Microscopía electrónica de transmisión

Inmediatamente después del corte del tejido, este fue fijado en paraformaldehído al 4%; glutaraldehído 1% en un buffer de cacodilato. Después de la fijación el tejido se reemplazó a una solución de tetróxido de osmio al 1%.

Las muestras fueron lavadas en PBS, deshidratadas mediante gradientes de alcohol y finalmente acetona. Se infiltraon en resina Durcupan ACM Fluka y se llevó a cabo la polimerización a 60°C durante 48 horas. Los bloques fueron cortados mediante ultramicrotomo Leica ultracut UCT (Leica, Heerbrugg, Switzerland) en secciones de 60-70 nm, Los cortes se montaron en mallas de 200 rejillas. Las secciones fueron teñidas con una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo, seguido de una tinción con citrato, ambas tinciones con una duración de 10 minutos. Las secciones teñidas fueron visualizadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 (Tokyo, Japan), realizadas a 100 kV. Las imágenes fueron adquiridas con un sistema de cámara digital GATAN (Orius 200SC).

### Estadística

Los experimentos fueron diseñados para usar el mínimo número de animals necesarios para dar un valor estadístico suficiente. La comparative fue similar a la publicada para ensayos parecidos<sup>87</sup>. Ningún animal fue excluido del análisis. Los datos fueron analizamos mediante análisis ANOVA de una cola, ANOVA de dos colas, y test de Student. El riesgo relativo fue medido mediante el test de Fisher de dos colas. Barras de error representan la desviación media típica. En todas las figuras corresponde un p-value de \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , y ns  $p > 0.05$ .

---

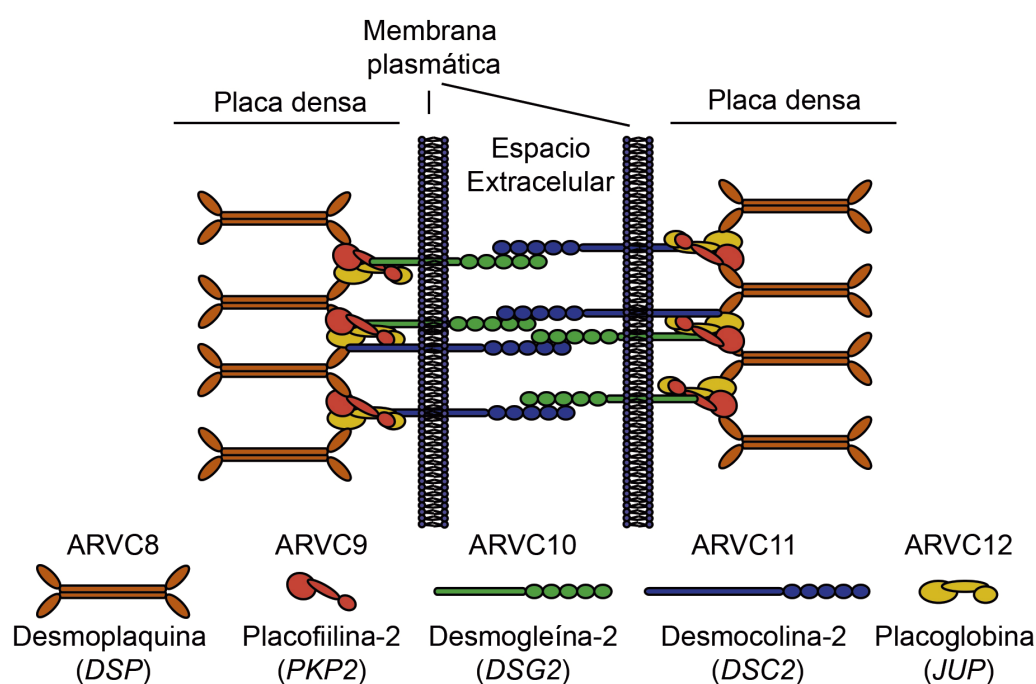
## *RESULTADOS*





## 1. Generación de modelos de ARVC por expresión específica de tejido del gen *plakophilin-2 (PKP2)*

A menudo ARVC es considerada una enfermedad desmosomal<sup>21</sup>, debido a la asociación que existe entre estos pacientes con mutaciones en genes que codifican para proteínas desmosomales (Figura 5). Los desmosomas son una clase de uniones focales responsables de mantener conectados los cardiomiocitos<sup>35</sup>, y cuya pérdida funcional desestabiliza la viabilidad del tejido. Dentro de las proteínas que conforman el desmosoma, placofilina-2 (PKP2) es la que se encuentra mutada en más pacientes con ARVC, llegando incluso a asociarse con más del 50% de los casos en algunas series clínicas.



**Figura 5. Proteínas desmosómicas involucradas en ARVC.** Estructura del desmosoma y sus componentes ligados a distintos tipos de ARVC: Desmoplaquina (DSP) ARVC8, Placofilina-2 (PKP2) ARVC9, Desmogleína-2 (DSG2) ARVC10, Desmocolina-2 (DSC2) ARVC11, y Placoglobina (JUP) ARVC12.

### 1.1 Construcción de vectores para generar virus adeno-asociados (AAV)

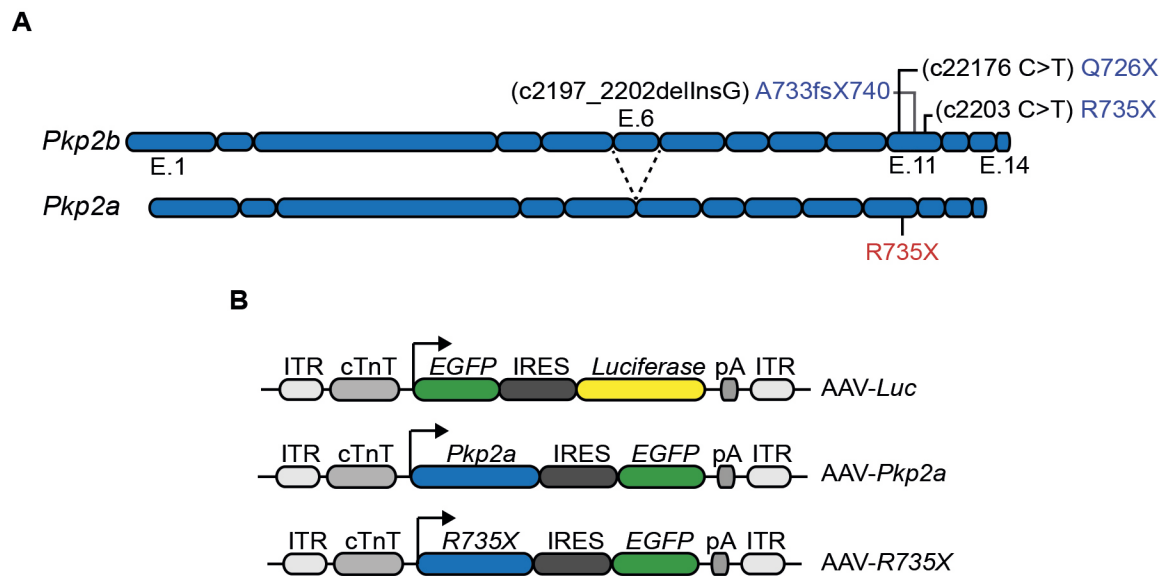
Los vectores AAV recombinantes que se utilizan en terapia génica o en estudios de ciencia básica, contienen tres elementos básicos: el transgen/es, los elementos reguladores (promotor, poli-A, etc), y las secuencias terminales repetidas, denominadas ITR (del inglés “*Inverted Terminal Repeats*”) que flanquean el genoma viral. Estas secuencias de 145 nucleótidos son los únicos elementos en *cis* que se necesitan para replicar y empaquetar los AAV. Así, generamos tres vectores AAV recombinantes para expresar bajo el promotor específico de cardiomiocitos troponina T el gen de la *Luciferasa* (*Luc*), como control de expresión y demostrar que una proteína no relacionada con el desmosoma no tiene efecto sobre la función cardíaca (AAV-*Luc*), *PKP2a* humano silvestre (isoforma específica de corazón), para determinar si expresar una proteína humana en un sistema heterólogo de ratón afecta al macro-complejo desmosmal (AAV-*PKP2*), y una versión truncada en el extremo C-terminal de *PKP2* (R735X), para estudiar si existe un efecto en dominante negativo sobre un complejo silvestre (AAV-R735X). Se escogió esta mutación R735X en el exón 11 que genera una versión truncada de la proteína PKP2 por que aparece mutada de manera recurrente en diferentes familias con ARVC<sup>40,88</sup> (Figura 6A). Además, estos vectores expresan una versión estable de la proteína fluorescente verde (EGFP, del inglés “*Enhance Green Fluorescent Protein*”) para identificar las células infectadas en el corazón (Figura 6B).

De todos los serotipos usados en terapia génica el serotipo 9 es el más eficiente infectando tejido cardíaco de ratón. Así, todos los vectores AAV recombinantes usados en este trabajo para transducir animales *in vivo* se empaquetaron con la cápsida del serotipo 9 y se administraron de manera sistémica por vía intravenosa<sup>79</sup>.

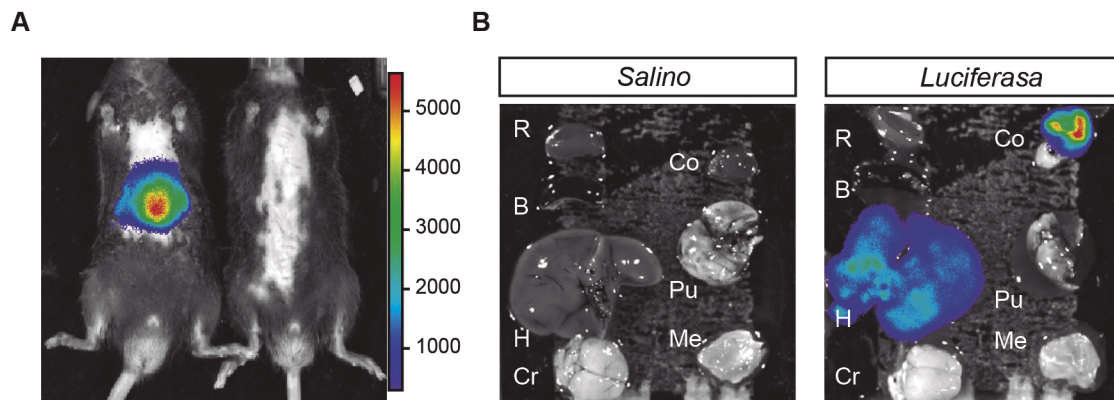
### 1.2 Transducción de AAV *in vivo*

Para generar modelos de AC y sus respectivos controles infectamos animales silvestres C56BL6J de entre 4 y 5 semanas con un total de  $3.5 \times 10^{10}$  partículas víricas por la vena femoral. En primer lugar, comprobamos los niveles de infección y de expresión de los AAV generados. Para ello, analizamos inicialmente un grupo de animales que expresaban la enzima *luciferasa* y analizamos su actividad sobre un sustrato luciferina tanto *in vivo*, como *ex vivo*. Así, después de inyectar la luciferina por vía intraperitoneal, ésta se oxida por la actividad enzimática de la luciferasa y emite bioluminiscencia. Esta emisión de luz es proporcional a la expresión del transgen. En todos los ratones transducidos con AAV-*luc* después de 4 semanas se puede observar señal bioluminiscente en la región abdominal/torácica (Figura 7A).

---



**Figura 6. Vectores para generar virus adeno asociados. A)** Alineamiento de las alternativas formas de splicing de la versión humana de Pkp2. El exón 6 está excluido en la isoforma cardíaca (Pkp2a). En azul están indicadas algunas de las mutaciones en el exón 11 de Pkp2b asociadas a ARVC (c.2176C>T, Q726X; c.2197\_2202delinsG, A733fsX740; c.2203C>T, R735X); la mutación utilizada en esta tesis está indicada en rojo (R735X). **B)** Vectores AAV codificando para la proteína humana silvestre Pkp2a o la variante mutante R735X, dirigidas bajo el promotor cardio-específico troponina T (cTnT) y seguidas por el reportero GFP mejorado (EGFP) bajo un sitio interno de unión ribosomal (IRES). El vector control expresa EGFP y luciferasa (Luc), localizadas después del promotor de la cTnT y un IRES respectivamente. Las secuencias terminales invertidas (ITR) y las secuencias de poliadenilación (pA) están también indicadas.



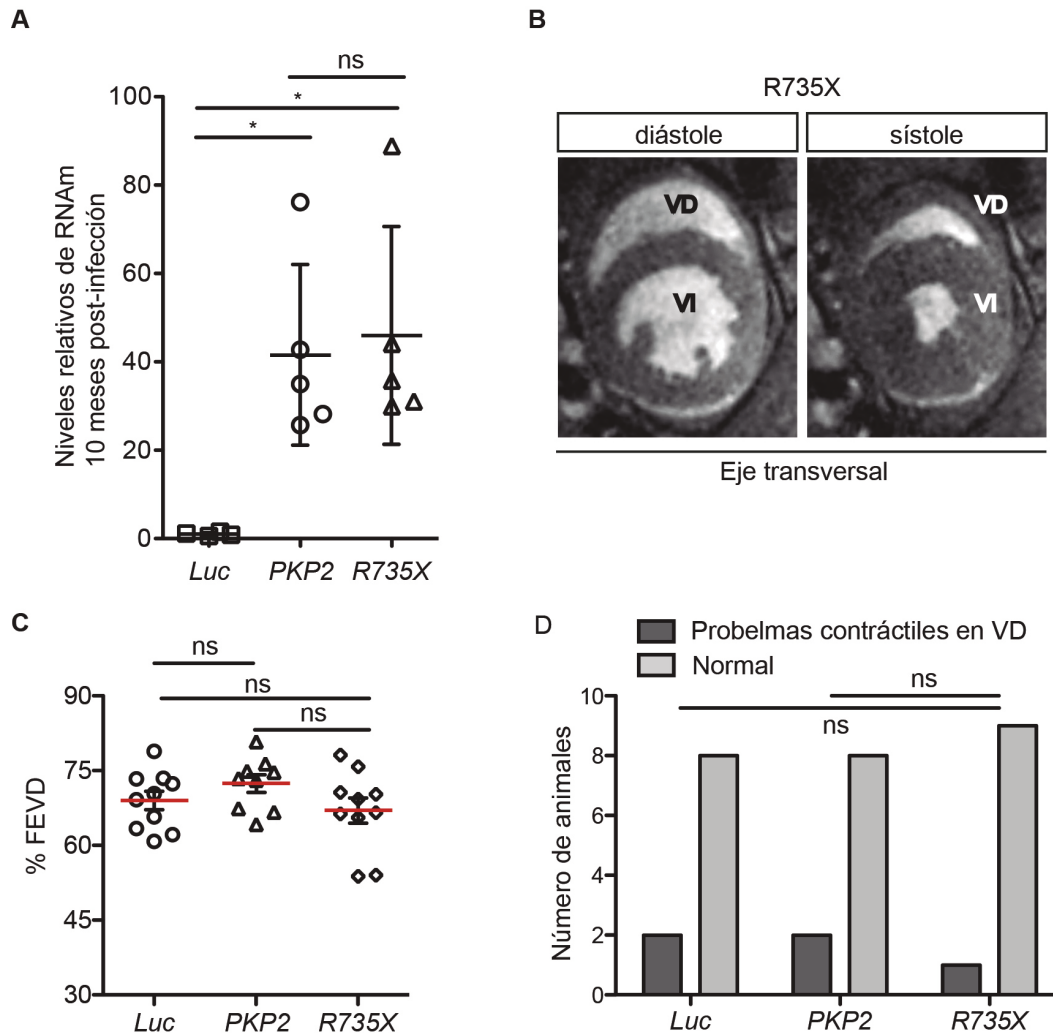
**Figura 7. Transducción de partículas AAV.** **A)** Imagen representativa mostrando la bioluminiscencia de la proteína luciferasa *in vivo* en ratones C57BL6J infectados a través de la vena femoral con una dosis de  $3.5 \times 10^{10}$  partículas víricas AAV9 de virus control (luc) en 50  $\mu$ l de solución salina, junto con un ratón control inyectado solamente con solución salina. Las imágenes fueron adquiridas 4 semanas después de la inoculación del virus. **B)** Imágenes *ex vivo* de señal bioluminescente de los órganos de ratones inoculados con virus control y con suero salino (Cr Cerebro; Co Corazón; R Riñón; Pu Pulmón; H Hígado; ME Músculo esquelético; y B Bazo). Se observa una predominante actividad luciferasa en corazón, con débil señal en hígado.

Para determinar que tejidos expresan mayor cantidad de luciferasa extrajimos los diferentes órganos y analizamos *ex vivo* su actividad enzimática. Aunque existe actividad luciferasa en el hígado la señal luminiscente más intensa se observa en el corazón y está ausente en el resto de tejidos analizados (Figura 7B). En conjunto, estos datos confirman que la combinación de AAV de serotipo 9 cardiopático junto al promotor específico de tejido cardíaco del gen de la troponina (cTnT) pueden permitir generar modelos animales de patologías cardíacas.

### 1.3 Análisis de expresión

Distintos estudios han sugerido que mutantes en PKP2 pueden generar RNA mensajeros (mRNA) o proteínas inestables, y asocian el fenotipo de AC con haploinsuficiencia o, dicho de otra manera, con una disminución significativa en los niveles totales del RNA y finalmente de proteína silvestre. Para cuantificar los niveles expresión de *PKP2* y *EGFP* después de infectar con AAV-PKP2 y AAV-R735X, analizamos los niveles de expresión de estos genes en corazón, hígado, y cerebro después de 4 semanas. Los datos de PCR cuantitativa (Q-PCR) confirmaron que *Pkp2* y *EGFP* se expresan en el tejido cardiaco de, animales silvestres y mutantes a niveles similares a los controles *Luc*. Del punto de vista comparativo, por ejemplo, los valores de expresión en corazón son 40 veces más altos que en hígado. (Figura 8A). Esta expresión de la proteína humana silvestre o mutante en corazón, no afectó a los niveles de mensajero endógenos de *Pkp2* de ratón (Figura 8B).

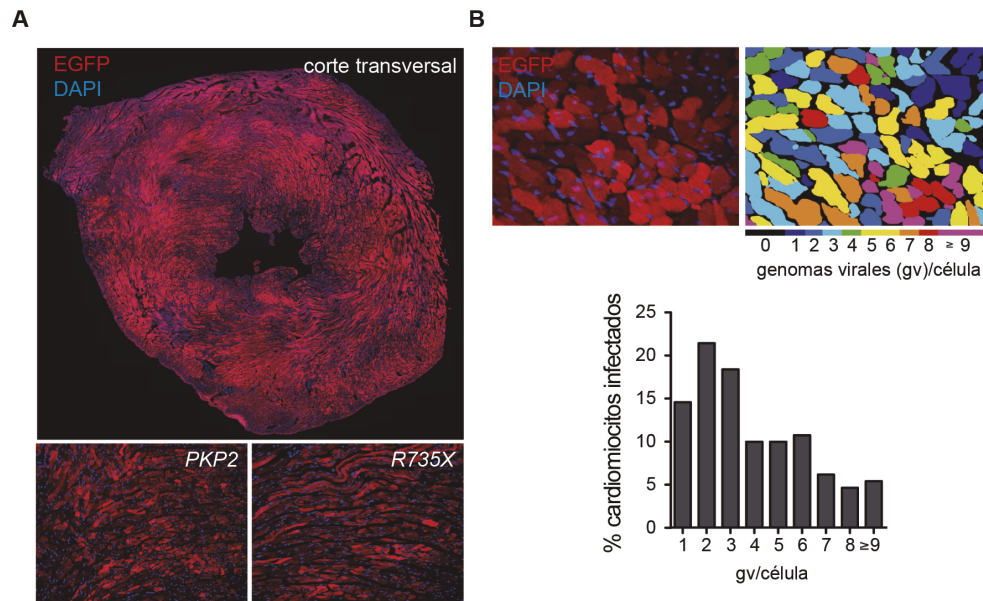
Por otro lado, a nivel de proteína, el análisis por western-blot demostró la traducción y estabilidad del mutante R735X a niveles similares a los observados en el silvestre, con una banda de 100 KDa en los animales transducidos con AAV-PKP2 y otra a 75 KDa animales AAV-735X, que corresponde con el tamaño esperado de la proteína truncada (Figura 8C), además estas proteínas no están presentes en las muestras de animales transducidas con AAV-Luc. En conjunto, estos datos confirman que el sistema de AAV permite expresar diferentes versiones de PKP2 específicamente en tejido cardiaco, demostrando ser una herramienta útil para generar modelos animales de ARVC.



**Figura 8. Análisis cuantitativo del transgen en corazón.** Análisis de expresión mediante qRT-PCR tras 4 semanas de infección con partículas AAV9. **A)** Se observa una elevada expresión de *EGFP*, *PKP2* y *R735X* en corazón en comparación con hígado o cerebro. **B)** Expresión de *Pkp2* endógeno estable en corazones infectados. **C)** Análisis proteico de corazones infectados expresando *PKP2a*, *R735X*, y *EGFP*. El asterisco en rojo indica las proteínas codificadas por el transgen inoculado.

## 1.4 Análisis de infección y distribución del transgen

El sistema circulatorio proporciona nutrientes y metabolitos al organismo, y sirve como vía de transporte general. En el caso de la circulación cardiaca, las arterias coronarias conducen el riego por toda la masa miocárdica, distribuyendo todo su contenido de forma uniforme. En principio, la inyección intravenosa de AAV deberían distribuirse de forma homogénea para infectar el corazón y otros órganos. Para evaluar la distribución de los AAV, analizamos la intensidad de la señal de la proteína EGFP en muestras de corazón transducidas con AAV-PKP2, AAV-R735X y con AAV-Luc. Imágenes representativas (Figura 9A) de varios experimentos muestran que la distribución de la señal de EGFP por todo el tejido cardiaco es homogénea. En estas condiciones de infección el  $95\pm 2\%$  de los cardiomiocitos son positivos para EGFP. Cortes transversales del tejido muestran un mosaico de infección, similar al patrón descrito en corazón por otros autores<sup>8</sup>. Usando herramientas de análisis de imagen (ImageJ), segmentamos cada célula para evaluar la intensidad de la señal de EGFP relativa de los cardiomiocitos de forma independiente y poder estimar así el número de genomas virales (gv) presentes en cada célula individual. Así, demostramos que más del 50% de los cardiomiocitos presentan entre 1 y 3 copias del transgen comparados con el control negativo, y el máximo de copias por células no llega a 10 gv y representa menos del 2% de los cardiomiocitos totales (Figura 9B). En conjunto, estos datos demuestran la capacidad de estos vectores AAV para infectar de forma uniforme el tejido cardiaco después de una única inyección por vía sistémica, que resulta en una expresión estable a lo largo del tiempo del transgen en el órgano diana.



**Figura 9. Distribución de vectores AAV en corazones infectados. A)** Imagen representativa de corazones transducidos con AAV, indicando la expresión de EGFP mediante microscopia de fluorescencia. Aumento de las imágenes mostrando una distribución en mosaico de la versión silvestre y la versión truncada de Pkp2a. **B)** Cuantificación mediante intensidad de fluorescencia de la expresión de la proteína transducida, usada para asignar un número de genomas víricos integrados por cardiomiocitos.

## 2. Análisis del modelo de cardiomiopatía arritmogénica (AC)

La penetrancia del gen *PKP2* mutante en el desarrollo de AC que se observa en portadores de mutaciones es muy variable y es difícil predecir cuándo y que individuos corren el riesgo de sufrir una arritmia o incluso la muerte. Dentro de las herramientas de diagnóstico más fiables que permiten identificar individuos con AC (Task Force 2010) que están en riesgo de sufrir un evento cardiovascular adverso, está el análisis por imagen de resonancia magnética (MRI). Los dos parámetros más útiles que definen AC mediante estudios de MRI incluyen la fracción de eyección del ventrículo derecho (FEVD) y la capacidad contráctil de la pared libre del VD. Así, analizamos por MRI la función cardíaca en animales de los tres grupos experimentales (*Luc*, *PKP2* y *R735X*).

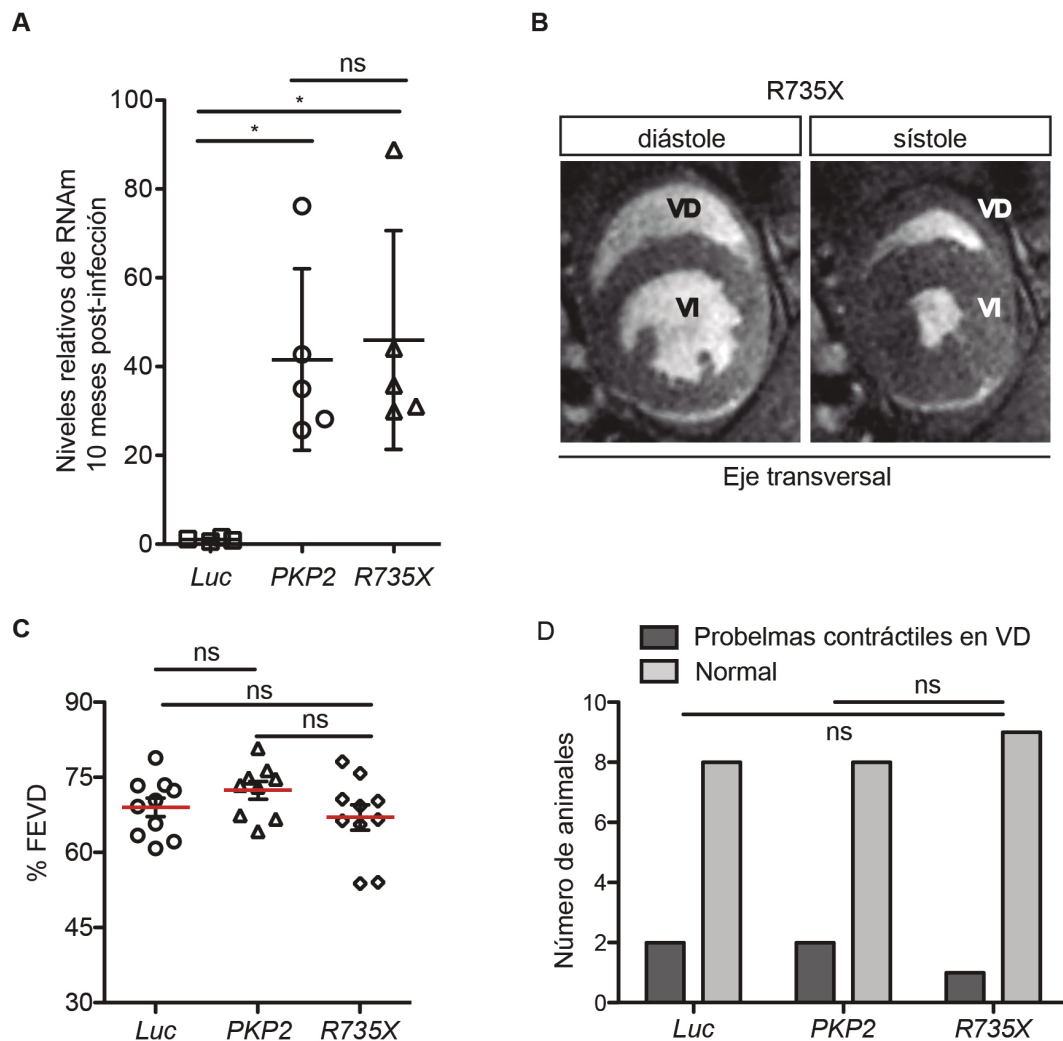


## 2.1 Análisis anatómico/funcional mediante imagen por resonancia magnética (MRI) cardíaca

Analizamos los valores de FEVD, los volúmenes ventriculares al final de sístole y diástole, y las anomalías en la movilidad de la pared libre del VD, de manera análoga a como se analiza en clínica en los pacientes con AC. Así, utilizados estos parámetros como indicadores de un fenotipo de AC en ratones que expresan *Luc*, *PKP2* o *R735X*. Después de la infección con AAV comprobamos que la expresión de los transgenes se mantiene después de 10 meses (Figura 10A). En la figura 10 se observa que la capacidad contráctil del corazón en animales inyectados con cualquiera de los AAV no está afectada en los diferentes tiempos analizados (Figura 10B).

Así, los valores de FEVD eran similares en los tres grupos AAV-Luc, AAV-PKP2 o AAV-R735X ( $68.9 \pm 1.8\%$ ;  $72.4 \pm 1.9\%$  y  $67 \pm 2.5\%$ , respectivamente) analizados 10 meses post-infección (Figura 10C; después de 10 meses;  $p=ns$ ,  $n=10$ ). Más aún, cuando analizamos las imágenes en cine del eje corto y largo del corazón de estos animales la contracción de la pared libre del VD era normal y los problemas contráctiles eran menores y limitados a un número muy reducido de animales (1/10, 2/10 y 2/10 en animales que expresan la mutación R735X, la versión silvestre PKP2 o Luc, respectivamente;  $p=0.78$ ) (Figura 10D).

En resumen, el análisis funcional por MRI, muestra que no existen alteraciones funcionales evidentes en ninguno de los grupos, ni por la expresión de un gen silvestre humano (*PKP2*) en un sistema heterólogo de ratón, ni por la expresión de un mutante de *PKP2* potencialmente patológico (R735X) en condiciones de inactividad física.



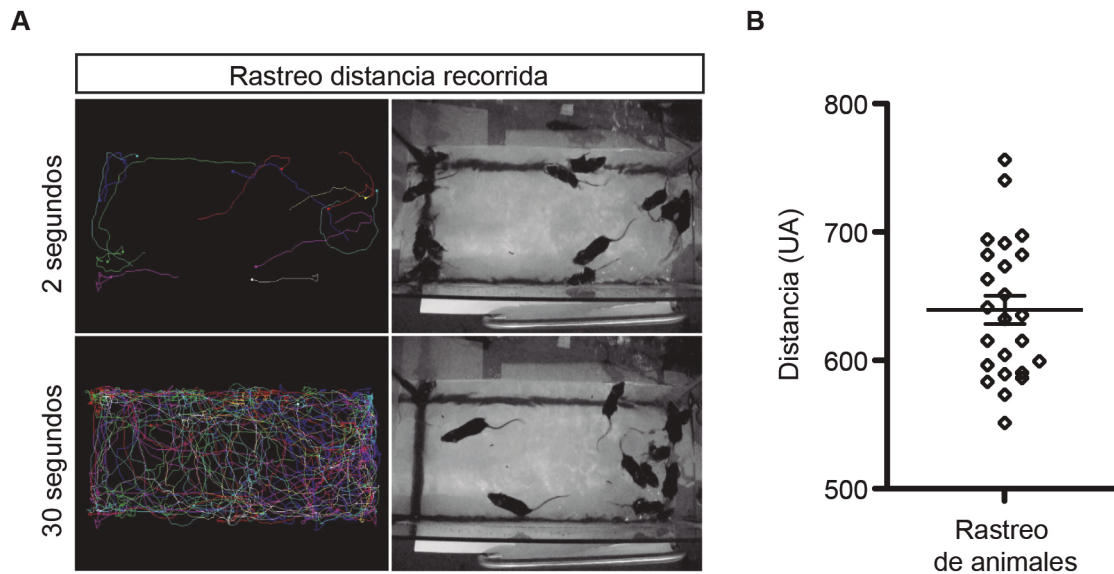
**Figura 10. Análisis anatómico mediante resonancia magnética cardiaca 10 meses post-infección. A)** Niveles de RNA mensajero del transcrito permanecen elevados tras 10 meses de infección con partículas Pkp2 silvestre y mutante; \* $p < 0.05$ . **B)** Imágenes representativas del eje corto de un corazón normal mediante resonancia magnética cardiaca, adquiridas al final de la diástole y sístole cardiaca de un animal transducido con la versión mutante R735X. **C)** Porcentaje de la fracción de eyección del ventrículo derecho (%FEVD) en animales sedentarios transducidos con vectores AAV luc, Pkp2 o R735X. **D)** Incidencia de eventos disquinéticos en la pared del ventrículo derecho de ratones transducidos.

### 3. Efecto del ejercicio en el desarrollo de AC

Los síntomas que puede presentar un individuo con ARVC es muy variable y depende en gran medida de la mutación que presenta y de factores ambientales que modifican la penetrancia de estas mutaciones. Así, individuos que comparten la misma mutación desarrollan la enfermedad en distintos momentos de su vida y con síntomas completamente diferentes. Desde hace más de 20 años, distintos estudios relacionan el ejercicio con la aparición de eventos arritmogénicos que desembocan en muerte súbita en individuos que presentan mutaciones en genes desmosomales<sup>1,50</sup>. De hecho, el ejercicio se asocia con un incremento en la penetrancia de la enfermedad en individuos con mutaciones en genes ligados a ARVC, y muerte súbita en el 20% de los casos en menores de 35 años<sup>1</sup>. En la misma línea, modelos animales de haploinsuficiencia para la proteína desmosomal placoglobina (JUP) presentan características clínicas de AC en condiciones de entrenamiento físico<sup>48</sup>. Sin embargo, no existen datos que demuestren que el ejercicio induce un fenotipo AC cuando se expresa una proteína mutante con efecto dominante negativo.

#### 3.1 Entrenamiento aeróbico

Los atletas jóvenes son más susceptibles de sufrir eventos arritmogénicos que individuos sedentarios de la misma edad<sup>58</sup>. Para estudiar el efecto del ejercicio en ratones que expresan un gen mutante humano de la proteína PKP2 en comparación con ratones control, entrenamos animales de distintos grupos (AAV-Luc, AAV-PKP2 o AAV-R735X) durante 8 semanas. Este entrenamiento, que comenzó 2 semanas post-infección, consistía en un programa de natación con incrementos graduales durante las 5 primeras semanas hasta alcanzar un esfuerzo máximo de 90min. Este nivel de esfuerzo se mantuvo durante 3 semanas adicionales. Comprobamos el nivel de ejercicio de todos los animales en distintos momentos tomando videos de 1 minuto de duración y calculando la distancia recorrida en esos intervalos de tiempo. Nuestros datos demuestran que todos los animales recorrieron distancias similares, y que el coeficiente de variación de estas distancias es menor al 10% (Figura 11; video suplementario 1).



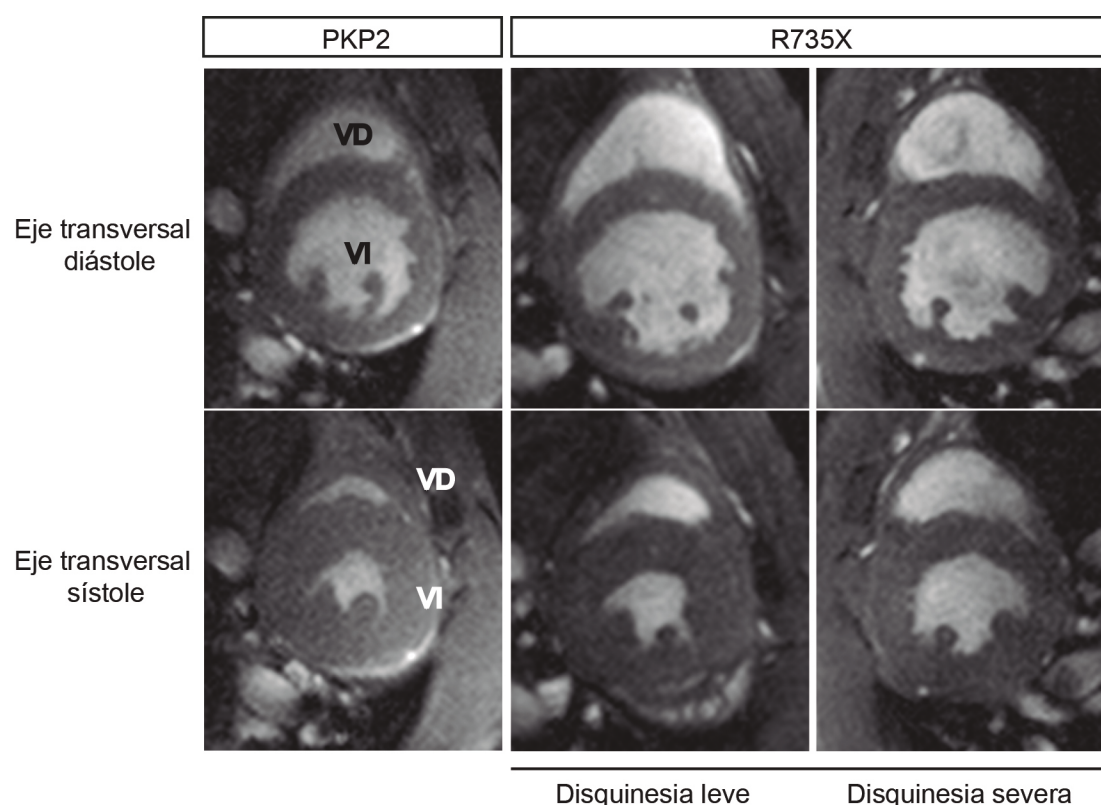
**Figura 11. Uniformidad en la intensidad del entrenamiento. A)** Seguimiento del camino recorrido durante el entrenamiento, a los 2 y a los 30 segundos. Los puntos y líneas representan el animal y el camino recorrido respectivamente. Video suplementario 1: entrenamiento natatorio de todos los grupos y su seguimiento para la cuantificación. Cada línea representa el rastreo de un único animal. **B)** Análisis de la distancia nadada, calculada a partir de un segmento aleatorio de tiempo que incluye más de 1000 frames consecutivos. Los datos muestran una distribución Gausiana (test de D'Agostino & Pearson;  $\alpha=0,05$ ).

Basándonos en estos datos asumimos que el ejercicio al que están sometidos todos los animales es uniforme y homogéneo, lo que nos permite asumir que las diferencias que se puedan observar no serán debidas a las diferencias durante el entrenamiento.

### 3.2 Efecto del entrenamiento en la función cardiaca (MRI)

Para evaluar la función cardiaca después de someter a ejercicio a los diferentes grupos de estudio (Luc, PKP2 y R735X), analizamos por MRI los valores de fracción de eyección del ventrículo derecho (FEVD) y la movilidad de la pared libre del VD tras 8 semanas de entrenamiento de estos animales. Las imágenes en cine del eje corto y largo del corazón mostraron anomalías en la contractilidad del VD, tal y como se ha descrito en pacientes AC<sup>7</sup>. El análisis de imagen puso de manifiesto que la movilidad de la pared libre del VD en animales que expresan la proteína R735X está reducida si la comparamos con animales controles (Figura 12; videos suplementarios 2,3,4). Estas anomalías contráctiles afectan la función global medido como FEVD. Los animales transducidos con PKP2 mutante R735X presenta valores significativamente menores ( $59.3 \pm 3.9\%$ ;  $n=10$ ) comparado con los controles PKP2 ( $72.4 \pm 1.9\%$ ;  $n=6$ ) o luc ( $74 \pm 2.7\%$ ;  $n=7$ ) ( $*p<0.05$ ; Figura 13A), lo que indica una relación directa entre el ejercicio y la disfunción ventricular general que

sufren los animales que expresan la proteína R735X. De la misma manera analizamos la contractilidad focal de la pared libre del VD usando las imágenes de MRI, que dividimos en 11 segmentos<sup>82,83</sup>, para clasificar la movilidad de la pared ventricular.



**Figura 12. Análisis anatómico mediante resonancia magnética cardíaca después de ejercicio intenso en animales infectados con AAV.** Imágenes representativas del eje corto mediante resonancia magnética cardíaca, adquiridas al final de la diástole y sístole cardíaca, en animales transducidos con la versión silvestre Pkp2 o la versión mutante R735X. Video suplementario 2: resonancia magnética cardíaca del eje corto ventricular desde el ápex hasta la base de un ratón expresando la versión silvestre Pkp2; Video suplementario 3: resonancia magnética cardíaca del eje corto ventricular desde el ápex hasta la base de un ratón expresando la versión mutante R735X. Nótese el evento disquinético en la porción basal del ventrículo derecho; Video suplementario 4: resonancia magnética cardíaca del eje corto ventricular desde el ápex hasta la base de un ratón expresando la versión mutante R735X. Nótese el evento disquinético severo en el ventrículo derecho e izquierdo.

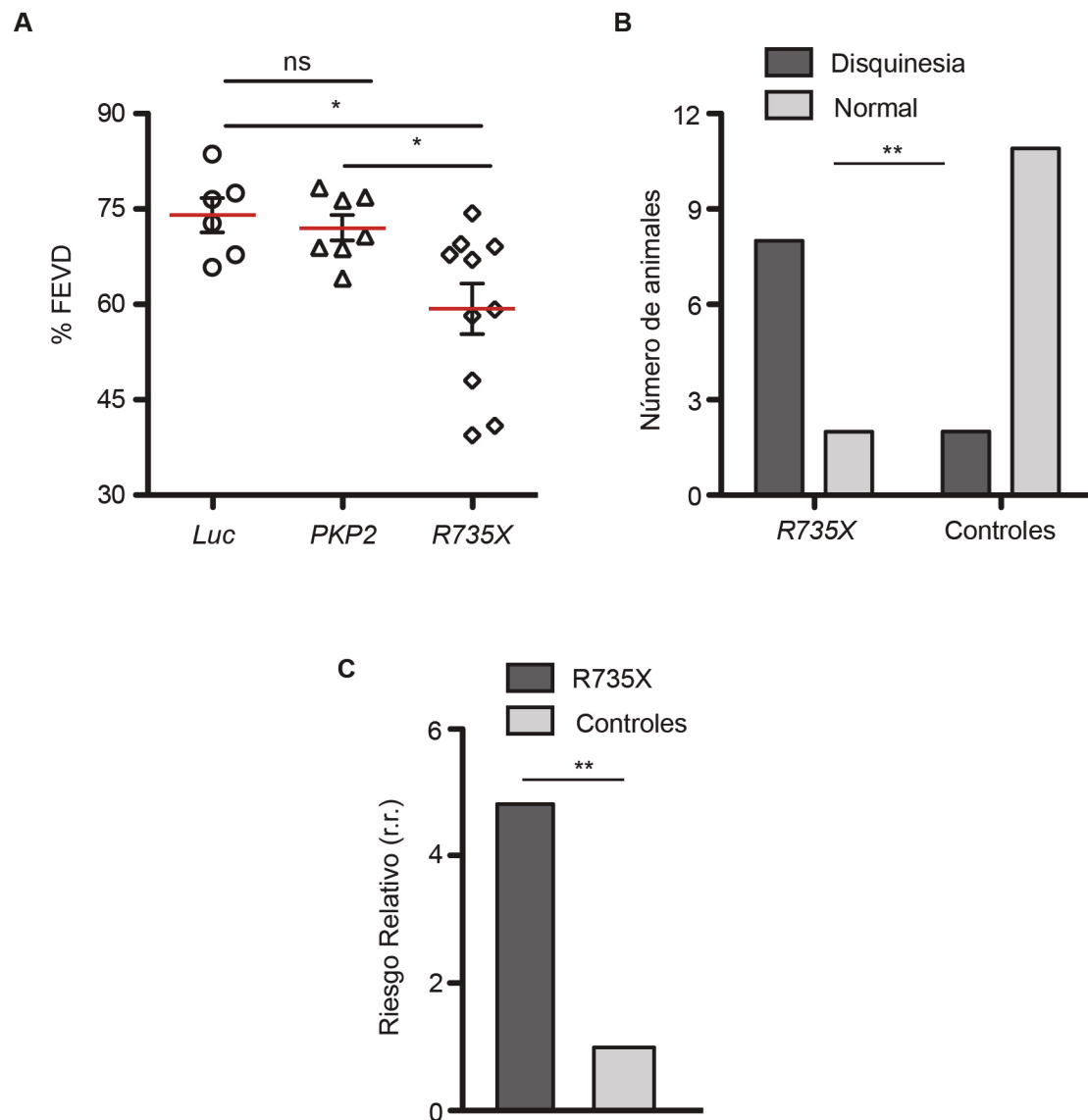
En este análisis clasificamos como movimiento anormal cuando existieran zonas de aquinesia, disquinesia (en sístole ventricular) o ensanchamiento (en diástole ventricular). El estudio muestra que 8/10 animales portadores de la mutación presentan eventos disquinéticos, comparado con 2/13 animales control (1/7 para la versión silvestre de PKP2 y 1/6 para animales luc) ( $p=0.008$ ; Figura 13B). Así, el análisis de riesgo relativo revela que portadores de la mutación presentan alrededor de 5,2 veces mayor probabilidad de sufrir eventos similares a los que sufren pacientes con ARVC en condiciones de ejercicio intenso (Figura 13C).

En conclusión, estos datos indican que la mutación R735X es patológica en condiciones de ejercicio, manifestando un fenotipo que se asemeja a pacientes con ARVC. En estos animales que expresan una mutación potencialmente patológica la fracción de eyección se encuentra reducida y en la movilidad de la pared libre del VD está afectada.

### **3.3 Caracterización estructural de conexiones cardiacas tras ejercicio.**

Los desmosomas ayudan a mantener la integridad del tejido cardíaco resistiendo las fuerzas de tensión mecánica a que está sometido el corazón. Cuando alguno de los componentes desmosomales está mutado, puede ocurrir que la adhesión intercelular y la estructura del tejido esté comprometida. De hecho, pacientes con ARVC presentan, en estadios avanzados de la enfermedad, alteraciones estructurales en el corazón<sup>34</sup>, aunque estos cambios no parecen tener un único origen. Lo que sí es probable es que la tensión extra a la que se somete el tejido cardíaco durante el ejercicio puede desencadenar el desarrollo de la enfermedad. Para caracterizar el desmosoma en condiciones de ejercicio extremo y estudiar el efecto de expresar un mutante asociado a la patología de ARVC (R735X), analizamos por inmunofluorescencia la localización de algunos de los componentes del desmosoma, placoglobina y placofilina-2, además de analizar la ultraestructura del complejo mediante microscopía electrónica de transmisión.

---

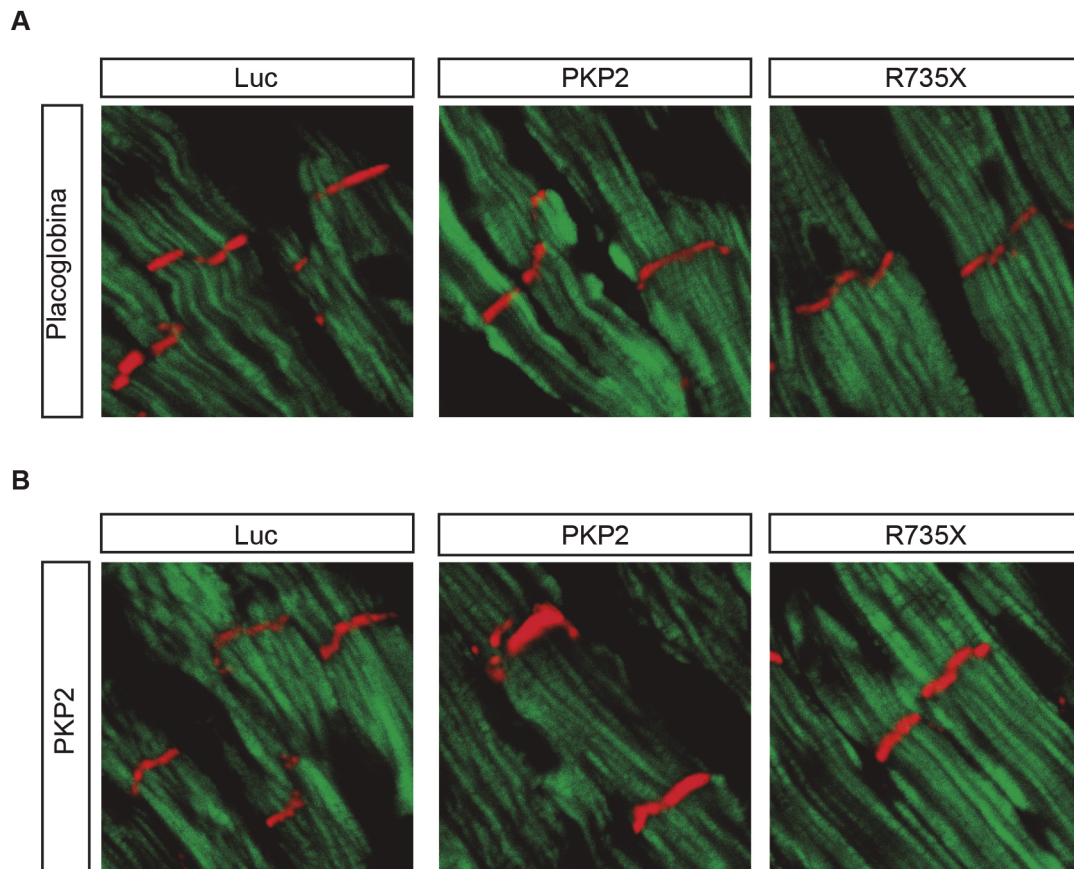


**Figura 13. Análisis cuantitativo y cualitativo del ventrículo derecho después de ejercicio intenso. A)** Porcentaje de la fracción de eyección del ventrículo derecho (%FEVD) en animales transducidos y entrenados durante 8 semanas; \* $p < 0.05$ . **B)** Incidencia y **C)** riesgo relativo de eventos disquineticos en la pared del ventrículo derecho de ratones control y R735X después de un entrenamiento de 8 semanas (riesgo relativo: 5,2); \*\* $p = 0.008$  (test de Fisher de dos colas).



### 3.3.1 Localización de placoglobina (Jup) como potencial marcador

En los últimos años se han sugerido diferentes marcadores para el análisis histológico de corte de corazón que puedan ayudar a identificar individuos con ARVC. Por ejemplo, se ha propuesto que la reducción o la localización nuclear de la proteína placoglobina (Jup)<sup>43</sup>, que potencialmente interferiría con la cascada de señales dependiente de Betacateninas, podría ser uno de ellos. Para comprobar si el ejercicio induce cambios a nivel molecular en la localización de Jup cuando se expresa la proteína mutante R735X, analizamos por inmunofluorescencia secciones de animales entrenados de los 3 grupos. No existen diferencias en la distribución de la proteína Jup cuando comparamos todos los grupos.



**Figura 14. Proteínas de desmosoma en ratones transducidos con AAV. A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia confocal de Placoglobina y **B)** Pkp2 localizadas en los discos intercalares de los cardiomiocitos. Para delimitar la fibra cardíaca se usó la autofluorescencia del cardiomiocito (verde).

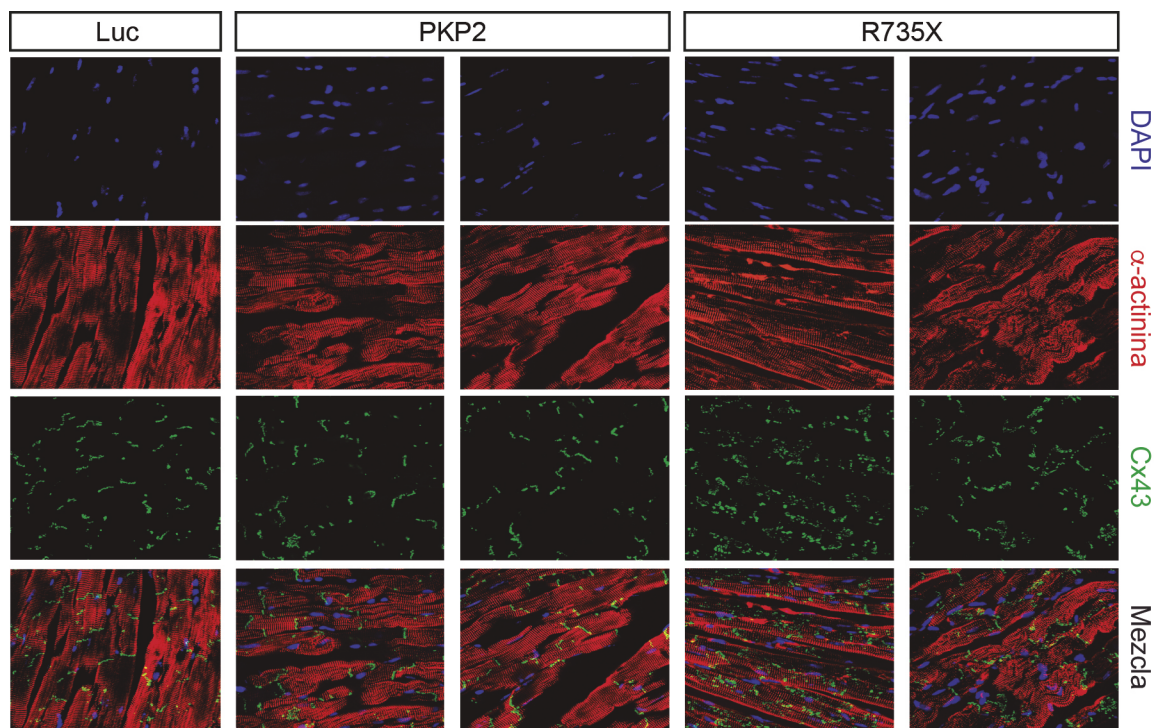


Las inmunofluorescencias muestran que Jup se localiza en los discos intercalares en los extremos de los cardiomiocitos, y la localización en núcleo es marginal y similar en todos los grupos (Figura 14A). También destacar que PKP2 localiza de las mismas áreas que Jup (Figura 14B), lo que indica que la cantidad y localización de la proteína endógena sigue localizando en el complejo desmosomal.

Estos datos indican que la presencia de la proteína PKP2 silvestre o mutante R735X no afecta la localización de Pkp2 al desmosoma y tampoco interfiere a la distribución de la proteína Jup en condiciones de ejercicio, siendo similar en todos los grupos analizados.

### 3.3.2 Análisis de Cx43 en uniones tipo gap entre cardiomiocitos

PKP2 no sólo se localiza en el desmosoma, estudios recientes han demostrado que PKP2 también se encuentra asociada a canales iónicos que se encuentran en uniones de tipo gap. Por ejemplo, estudios de interacción proteína-proteína han demostrado que PKP2 interacciona de manera directa con una de estas proteínas, la conexina 43 (Cx43), a través de su dominio N-terminal<sup>89,90</sup>. La Cx43 es un componente esencial de las uniones tipo gap que conectan de manera funcional células adyacentes. En el caso particular de los cardiomiocitos, Cx43 forma canales que permiten la comunicación y acoplamiento eléctrico para una contracción cardíaca adecuada<sup>91</sup>. El mutante R735X de PKP2 es una proteína truncada en el dominio C-terminal, que se encuentra en el mismo complejo que Cx43, es posible que el dominio C-terminal pudiera afectar la distribución o estabilidad de la proteína Cx43. Este efecto sobre Cx43 podría justificar eventos de movilidad reducida en ventrículo de modo similar a lo que se observa en pacientes con mutaciones en desmogleína-2<sup>33</sup>. Mediante microscopía confocal analizamos el efecto de la expresión de la proteína mutante R735X en la distribución de la proteína Cx43 en condiciones de ejercicio y la comparamos con secciones de corazón en condiciones sedentarias. Las muestras de corazón teñidas para identificar por inmunofluorescencia Cx43 demuestran que la localización de Cx43 está significativamente alterada en los animales mutante que se han sometido a ejercicio extremo (Figura 15).

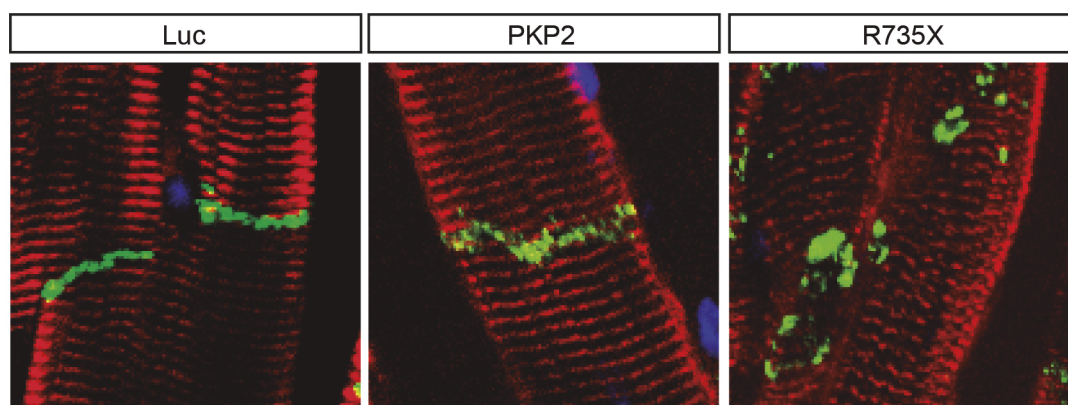
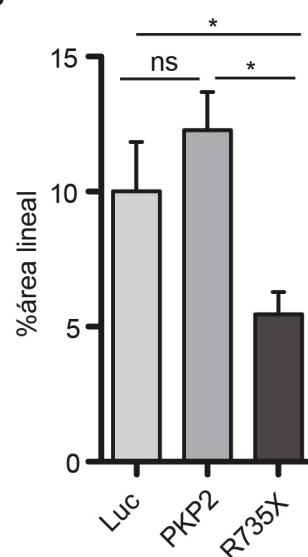


**Figura 15. Distribución de Conexina 43 (Cx43) en ratones transducidos con AAV.** Análisis por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal de corazones transducidos con AAV mostrando la localización de Cx43 (verde) y alfa-actinina (rojo). La tinción 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) fue usada para detectar núcleos celulares.

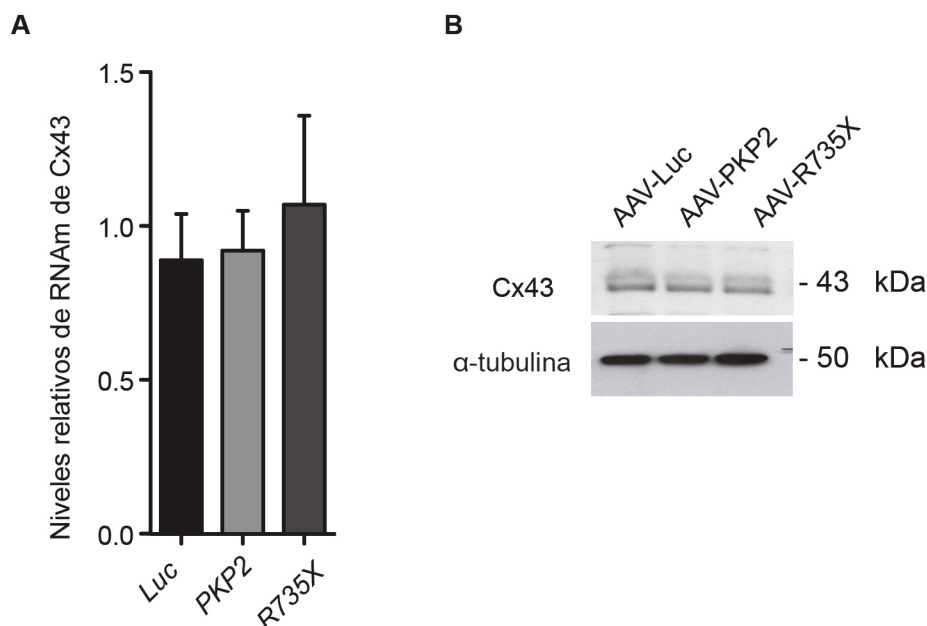
La señal que corresponde a Cx43 aparece dispersa si la comparamos con la distribución lineal en los extremos de los cardiomiocitos que aparece en animales control. Estas imágenes muestran que la localización de Cx43 se encuentra en zonas laterales entre cardiomiocitos y que las estructuras lineales típicas de los extremos de dos células anexas están reducidas (Figura 16A). Un análisis cuantitativo/cualitativo de estas estructuras lineales muestra que la expresión de R735X disminuye de manera significativa en la formación de estas estructuras lineales solo en animales que se someten a ejercicio (Figura 16B; \* $p < 0.05$ ), lo que sugiere que la alteración en la contracción en estos animales esté relacionada con la deslocalización de Cx43 de estas estructuras lineales de conexión entre cardiomiocitos.

Mutantes en la proteína desmosomal Jup induce cambios en los niveles de expresión de Cx43 en pacientes con ARVC<sup>92,93</sup>. Para comprobar si esto también ocurre en animales que expresan la proteína mutante R735X, analizamos muestras de corazón de los diferentes grupos a nivel de mRNA y proteína. Nuestros datos indican que la versión R735X no afecta ni a la transcripción, ni a los niveles de proteína de Cx43 (Figura 17A y B). En conjunto estos datos indican que la

deslocalización, y no los niveles de proteína de Cx43, en animales sujetos a ejercicio extremo puede ser responsable de las alteraciones contráctiles observadas en MRI.

**A****B**

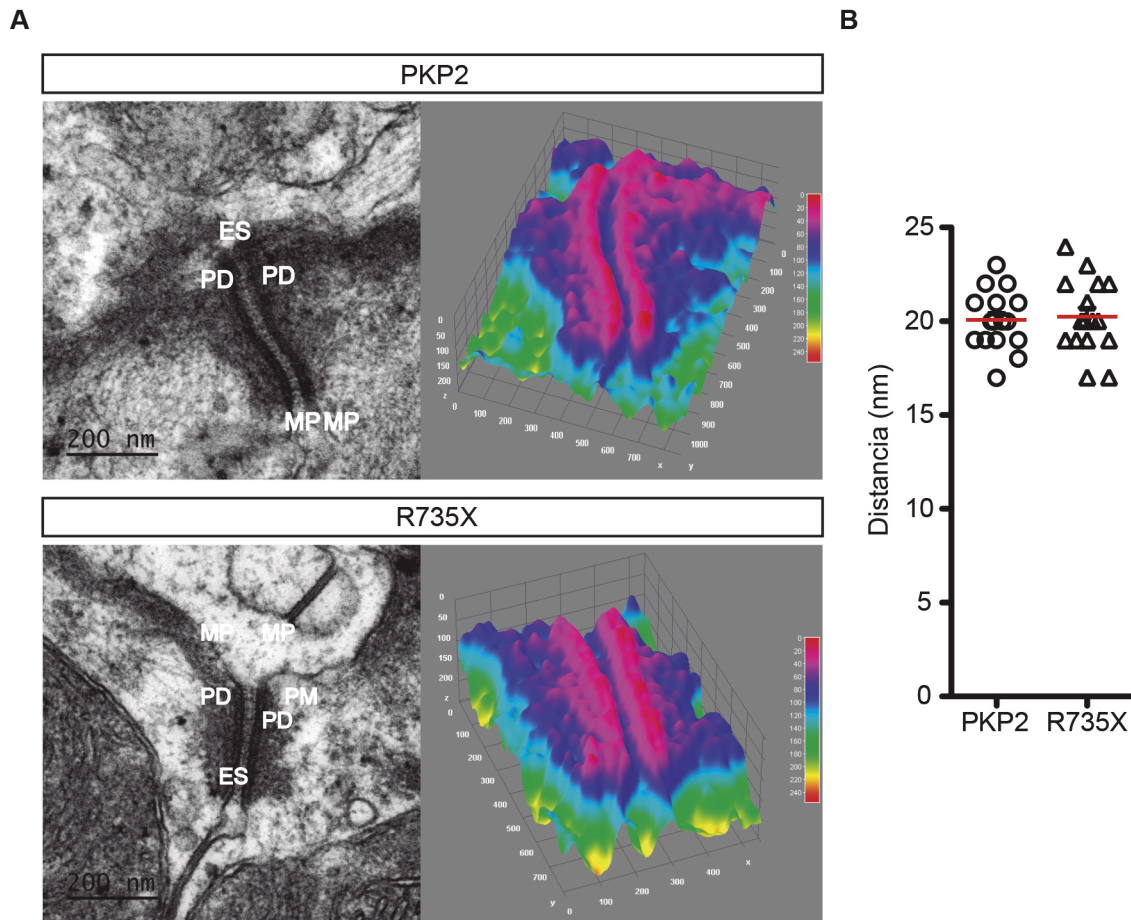
**Figura 16. Deslocalización de Cx43 con el entrenamiento. A)** Imagen representativa del cardiomiocito. **B)** Valor medio de áreas lineales de Cx43 localizada en los extremos de los cardiomiocitos, en al menos 3 animales y más de 150 células por gen transducido; \* $p < 0.05$



**Figura 17. Análisis cuantitativo de Cx43 después del entrenamiento. A)** Análisis mediante qRT-PCR y **B)** western blot de Cx43. Los niveles de Cx43 permanecen inalterados tras el ejercicio.

### 3.3.3 Microscopia Electronica

Para estudiar si la ultraestructura del complejo desmosomal está afectada en condiciones de ejercicio analizamos por microscopía electrónica de transmisión muestras de corazón de animales entrenados y los comparamos con muestras de animales sedentarios. En el análisis de imagen (representación tridimensional de intensidades) de las preparaciones de corazón se observa que la organización de los desmosomas es normal y no existen diferencias significativas entre los grupos (Figura 18A). Después de procesar las imágenes se midió la distancia entre placas densas y determinar el espacio intercelular (Figura 18B), este análisis indica que los desmosomas presentan una disposición normal y que la estructura general de los desmosomas que analizamos no se ve afectada por la expresión del mutante R735X en ninguno de los grupos o condiciones analizados ( $20,02 \pm 3,4$  nm de distancia en animales silvestres frente a los  $20,19 \pm 3,9$  en animales mutantes;  $n=16$ ; n.s.  $p>0,05$ ).



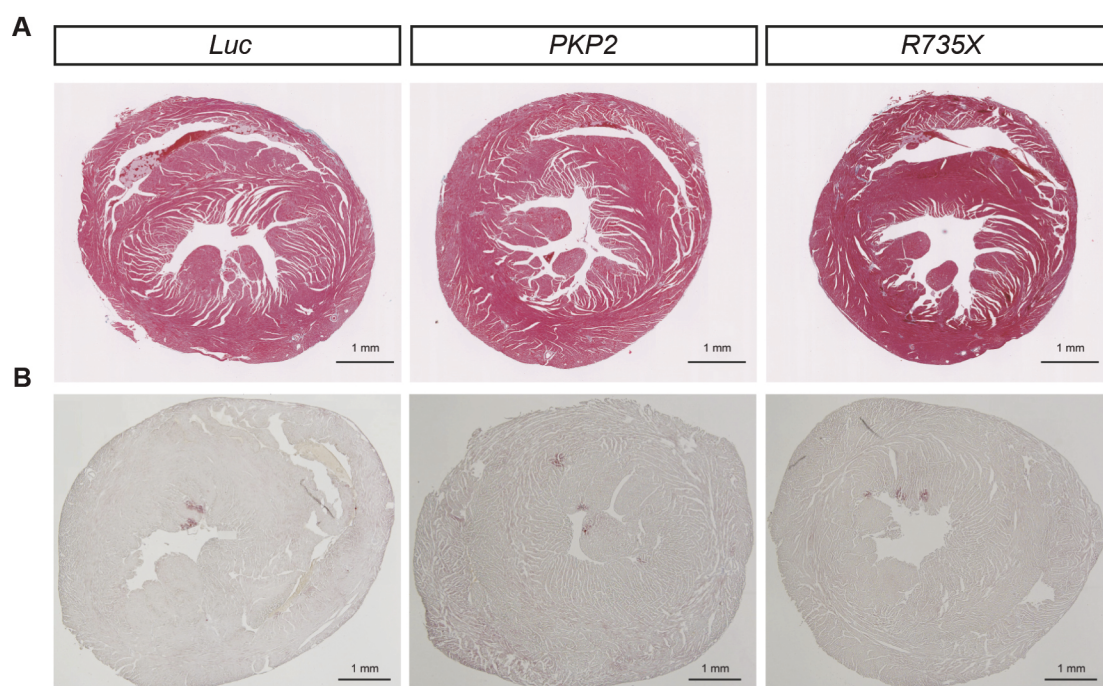
**Figura 18. Análisis estructural del desmosoma mediante microscopía electrónica de transmisión. A)** Imágenes representativas de desmosomas de corazones transducidos con versión silvestre PKP2a y la mutación R735X (PD = placa densa; ES = espacio extracelular; MP = membrana plasmática). El mapa de color en función de la intensidad muestra una mejor visualización de las placas densas de los desmosomas. Barra=200 nm. **B)** Distancia entre las placas densas de las uniones desmosomales.

### 3.4 Análisis histológico

En ocasiones, pacientes con ARVC desarrollan en estadios avanzados de la enfermedad una acumulación de tejido fibrótico o fibroadiposo en la pared libre del ventrículo derecho<sup>94</sup>, siendo uno de los parámetros a valorar en el diagnóstico de ARVC<sup>7</sup>. Un ejemplo de modelo animal que recapitula esta característica de la enfermedad humana es el ratón deficiente en desmoplakina 2 (*Dsp2*) que acumula exceso de grasa y fibrosis en el tejido cardíaco<sup>95</sup>. Sin embargo, otros estudios en humanos o en modelos de ratón demuestran que esta “sustitución” de tejido cardíaco por tejido fibroadiposo no es necesario para desarrollar la enfermedad. Por ejemplo en animales haplo-insuficientes en *Jup*, presentan un ventrículo derecho (RV) dilatado, disfunción ventricular y



arritmias, sin ningún tipo de infiltración fibroadiposa<sup>48</sup>. Para comprobar si los cambios funcionales observados por MRI que observamos en ratones que expresan R735X comparado con los animales control están relacionados con la acumulación cardíaca de tejido fibroadiposo, analizamos cortes histológicos de los 6 grupos (AAV-PKP2, AAV R735X, y AAV-Luc en condiciones sedentarias y ejercicio) y teñimos con tricrómico y Oil-Red. Ninguna de las muestras que analizamos presentaban infiltración fibroadiposa en corazón (Figura 19). Todas las imágenes analizadas eran comparables entre sí, con pequeños focos de fibrosis perivascular y algunos depósitos grasos, sin diferencias entre grupos. En resumen, el análisis histológico en animales que expresan el transgen mutante no induce recambio celular después del ejercicio mientras que, si presenta cambios funcionales, lo que indica que la sustitución fibroadiposa no es la causa de la disfunción ventricular que presentan los animales R75X en condiciones de entrenamiento extremo.

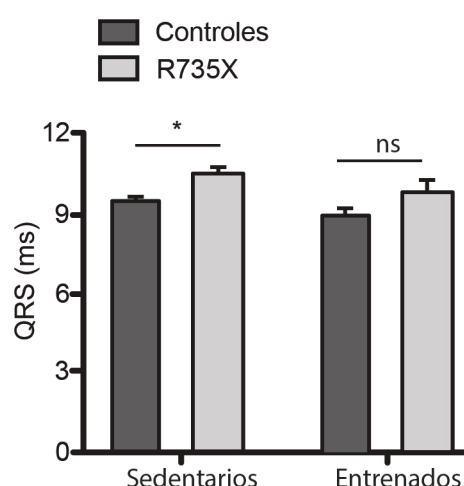


**Figura 19. Ausencia de grasa en el tejido cardíaco después del entrenamiento.** Imágenes representativas de corazones entrenados. **A)** Tinción tricrómica para ver tejido fibrótico **B)** Tinción Oil red usada detectar tejido graso (en rojo). Barra=1 mm

### 3.5 Estudio electrocardiográfico después del ejercicio

Una de las características típicas de la cardiomiopatía ARVC incluye cambios eléctricos asociados a arritmias ventriculares y la muerte súbita de éstos paciente. Las extrasístoles y taquicardias ventriculares pueden detectarse en humanos mediante estudios electrocardiográficos (ECG), aunque pueden aparecer anomalías eléctricas adicionales como por ejemplo la inversión de la onda P o el alargamiento del QRS. En ratones de experimentación no se producen arritmias sostenidas. Por esta razón centramos nuestros esfuerzos en medir la duración del QRS en todos los grupos de animales.

Durante los estudios ECG se observaron diferencias significativas en la duración del segmento QRS en animales sedentarios. Animales portadores de la mutación mostraron un aumento en la duración del QRS comparado con animales silvestres ( $10,44 \pm 0,29$  ms y  $9,47 \pm 0,2$  ms respectivamente;  $p=0,012$ ). Sin embargo, cuando los animales se sometieron a entrenamiento las diferencias encontradas no eran significativas, aunque se observó una tendencia a prolongar el segmento QRS ( $9,8 \pm 0,13$  ms versus  $9 \pm 0,36$  ms en controles;  $p=0,23$ ; Figura 20). Así, estos datos indican que estadios primarios de la enfermedad podrían caracterizarse con anomalías en el ECG en condiciones de reposo.



**Figura 20. Anomalías en el segmento QRS.** Duración del segmento QRS en animales control y portadores de la mutación en animales sedentarios 6 meses post-infección, y en animales tras someterse a un entrenamiento natatorio de 8 semanas; \* $p < 0.05$ , ms= milisegundos.

#### 4. Cardiotoxicidad y ARVC.

Una de las hipótesis que tratan de explicar cómo se origina la dilatación del ventrículo derecho y/o la infiltración fibroadiposa en corazones de pacientes con ARVC, sostiene que la muerte del cardiomiocito es el suceso inicial. En este tejido, el hueco que deja el cardiomiocito contribuiría a distender el tejido ya que el espacio se ocupada por otro tipo celular. Estas nuevas células no tendrían las mismas características físicas que un cardiomiocito e incluso podrían tener la capacidad de acumular grasa y/o colágeno.

Para comprobar si la muerte del cardiomiocito acelera el desarrollo de ARVC en animales que expresan el mutante de PKP2 (R735X), usamos un modelo de cardiotoxicidad inducido por fármacos antineoplásicos<sup>52-54</sup>. Uno de los más utilizados en clínica en las últimas décadas ha sido el antracíclico doxorrubicina<sup>55-59</sup>. Durante el tratamiento con doxorrubicina, los cardiomiocitos parecen ser la población celular más susceptible a su efecto tóxico, que incluye la generación de radicales libres<sup>62-63</sup>, la activación de rutas pro-apoptóticas y necróticas con aparición de fibrosis<sup>64-66</sup>, el aumento de la peroxidación lipídica<sup>67</sup> y el daño al ADN mitocondrial<sup>68,69</sup>.

##### 4.1 Análisis histológico y funcional tras tratamiento con doxorrubicina

Después de tratar animales que expresaban PKP2 silvestre o R735X mutante con doxorrubicina con una dosis acumulada de 15mg/kg en dos semanas, analizamos a nivel funcional y anatómico los corazones de estos animales. Veinticuatro horas tras la última dosis de antraciclinas se realizaron MRI antes de sacrificar los animales. En primer lugar, analizamos la función cardiaca por MRI de los valores de FEVD, y volumen del VD al final de sístole (ESV) y diástole (EDV). Las imágenes en cine del eje corto del corazón mostraron anomalías en la contractilidad del VD aunque el análisis cuantitativo no determinaba diferencias significativas entre los grupos (Tabla 5). Aun así, se observa una clara tendencia de los animales infectados con R735X a presentar volúmenes mayores del ventrículo derecho, así como ineficiencia en la contracción del VD.

El posterior análisis histológico confirmo estas tendencias que se observaban por MRI. Los corazones de los 4 grupos (PKP2 y R735X, con y sin doxorrubicina) en secciones transversales y teñidas con hematoxilina eosina (H&E) muestran dilatación del VD de animales AAV-R735X en comparación con los controles que expresan PKP2 silvestre tras el tratamiento con doxorrubicina (Figura 21A). El tratamiento con doxorrubicina no solo resulta en la aparición de dilatación ( $13,97 \pm 1,8\%$  versus  $10 \pm 1,25\%$  en animales tratados con doxorrubicina expresando la versión

---

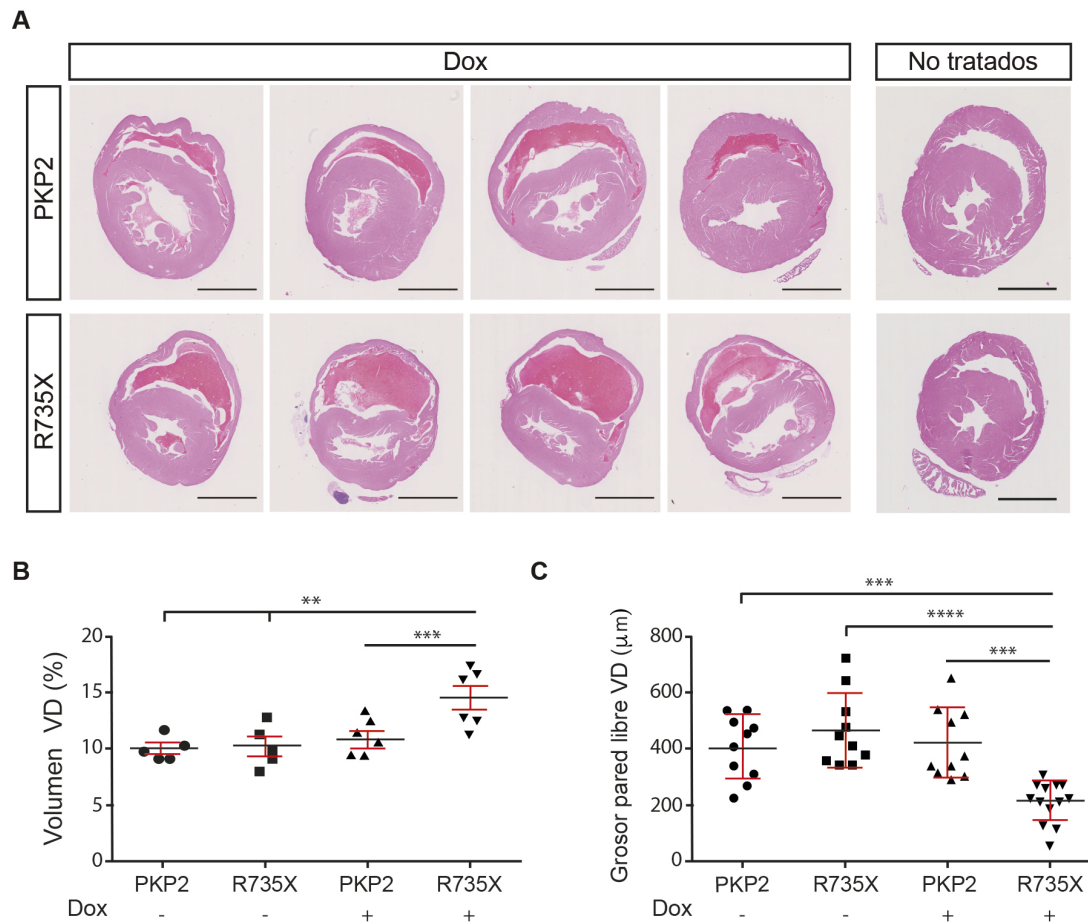


mutante y silvestre respectivamente;  $p < 0,001$ ; Figura 21B) sino que también está acompañada de una disminución en el grosor de la pared libre del VD ( $220,85 \pm 71,9 \mu\text{m}$  respecto  $430 \pm 126 \mu\text{m}$  en animales silvestre;  $p = 0,0002$ ; Figura 21C), similar a lo que ocurre en estudios de cardiotoxicidad realizados en conejos<sup>116</sup>. En conjunto estos datos sugieren que la cardiotoxicidad mediada por doxorubicina puede contribuir significativamente al desarrollo de ARVC en pacientes que expresan versiones mutantes de PKP2. Este hecho debería tenerse en cuenta y tener precauciones especiales al tratar estos pacientes con terapias antineoplásicas que puedan dañar el corazón.

**Tabla 4**

PARÁMETROS CARDIACOS (VD) TRAS ADMINISTRACIÓN DE DOXORRUBICINA

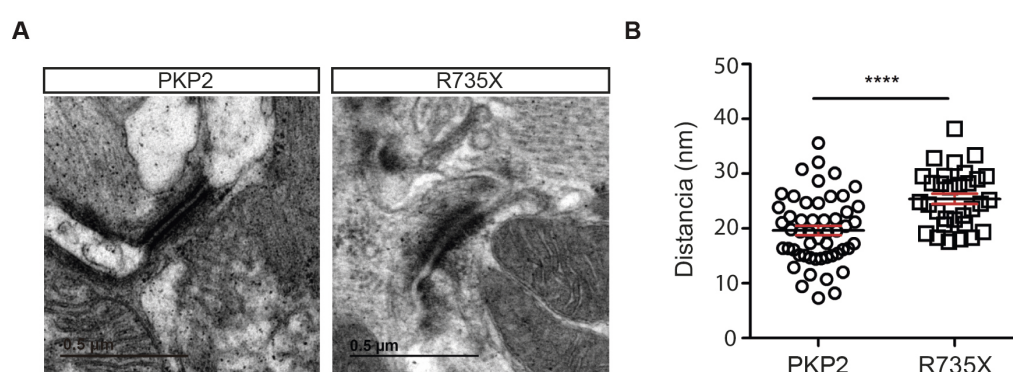
<b>Grupo animales</b>	<b>FEVD %</b>	<b>ESV(<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>EDV(<math>\mu\text{l}</math>)</b>	
PKP2	$68,6 \pm 5,9\%$	$21,1 \pm 6,3$	$67,8 \pm 7,9$	n=5
PKP2-R735X	$65,9 \pm 8,2\%$	$23,8 \pm 4,4$	$69,7 \pm 8,2$	n=5
PKP2-Dox	$68,9 \pm 7,5\%$	$24,2 \pm 10,8$	$68,9 \pm 7,5$	n=7
PKP2-R735X-Dox	$62,1 \pm 9,7\%$	$28,9 \pm 6,9$	$75,1 \pm 1,9$	n=7



**Figura 21. Anomalías estructurales tras el tratamiento con doxorrubicina. A)** Imágenes de muestras de corazón teñidas con Hematoxilina-eosina de animales transducidos y tratados con doxorrubicina. Se observa una clara dilatación del ventrículo derecho en corazones tratados y portadores de la mutación. Barra=2 mm. **B)** Porcentaje del área de ventrículo derecho en animales transducidos. En animales portadores de la mutación se observa un incremento tras el tratamiento con doxorrubicina; \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ . **C)** Grosor de la pared libre del ventrículo derecho; con una significativa disminución en animales portadores de la mutación y tratados con el quimioterápico; \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

## 4.2 Análisis estructural de desmosomas tras tratamiento con doxorrubicina

Para estudiar si los cambios morfológicos que se observan en los corazones de animales AAV-R735X tratados con doxorrubicina se correlacionan con cambios estructurales a nivel celular, comparamos las imágenes de muestras de corazón de estos animales mediante microscopía electrónica de transmisión. El análisis de imagen puso de manifiesto que la densidad de las placas desmosomales de la pared libre del VD en animales que expresan la proteína R735X y tratados con doxorrubicina son menos electrodensas que en los controles (Figura 22A).



**Figura 22. Desorganización en desmosomas tras el tratamiento con doxorrubicina. A)** Imágenes representativas de corazones transducidos y tratados con doxorrubicina mostrando una mayor desorganización del desmosoma en animales portadores de la mutación. Barra=0.5 μm. **B)** Distancia intercelular entre placas densas en más de 15 desmosomas; \*\*\*\* $p<0.0001$ .

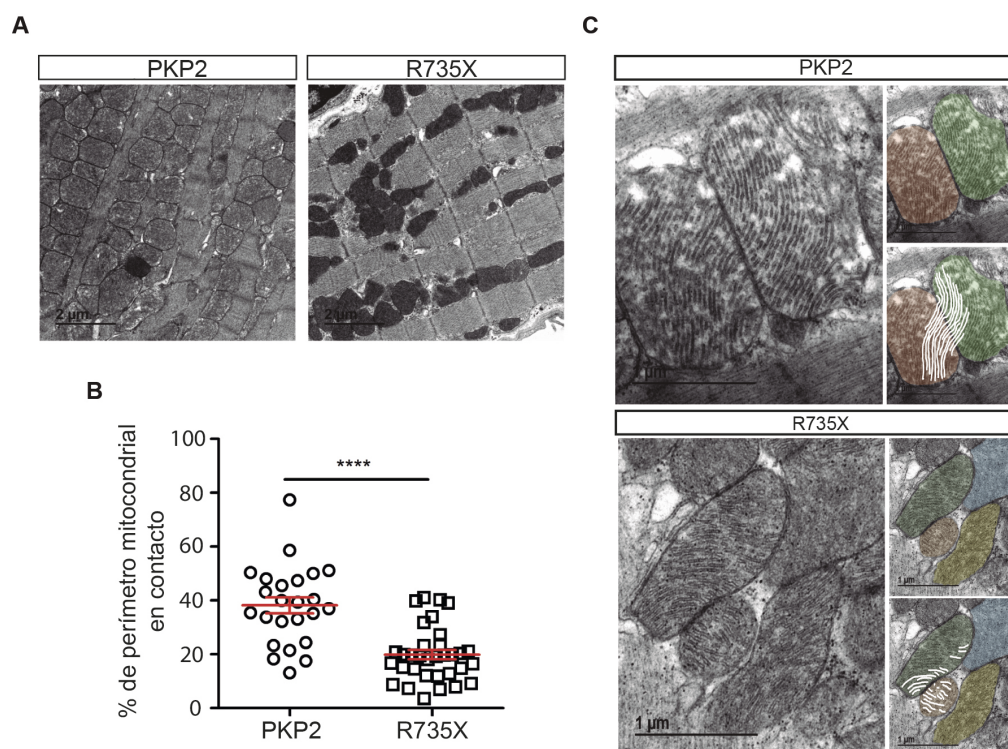
Así mismo, el desmosoma no solo se encuentra desorganizado, sino que la distancia entre las placas de células contiguas en los animales inyectados con AAV-PKP2 mutante R735X presenta valores significativamente mayores ( $25,4\pm5,3$  nm;  $n=50$ ) comparado con los controles PKP2 ( $19,5\pm6,2$  nm;  $n=50$ ) ( $*p<0.05$ ; Figura 22B). Estos datos sugieren una relación directa entre el tratamiento con un cardiotóxico como la doxorrubicina y la desorganización del desmosoma entre cardiomiocitos que sufren los animales que expresan la proteína R735X mutante.

### 4.3 Análisis estructural de mitocondrias tras tratamiento con doxorubicina

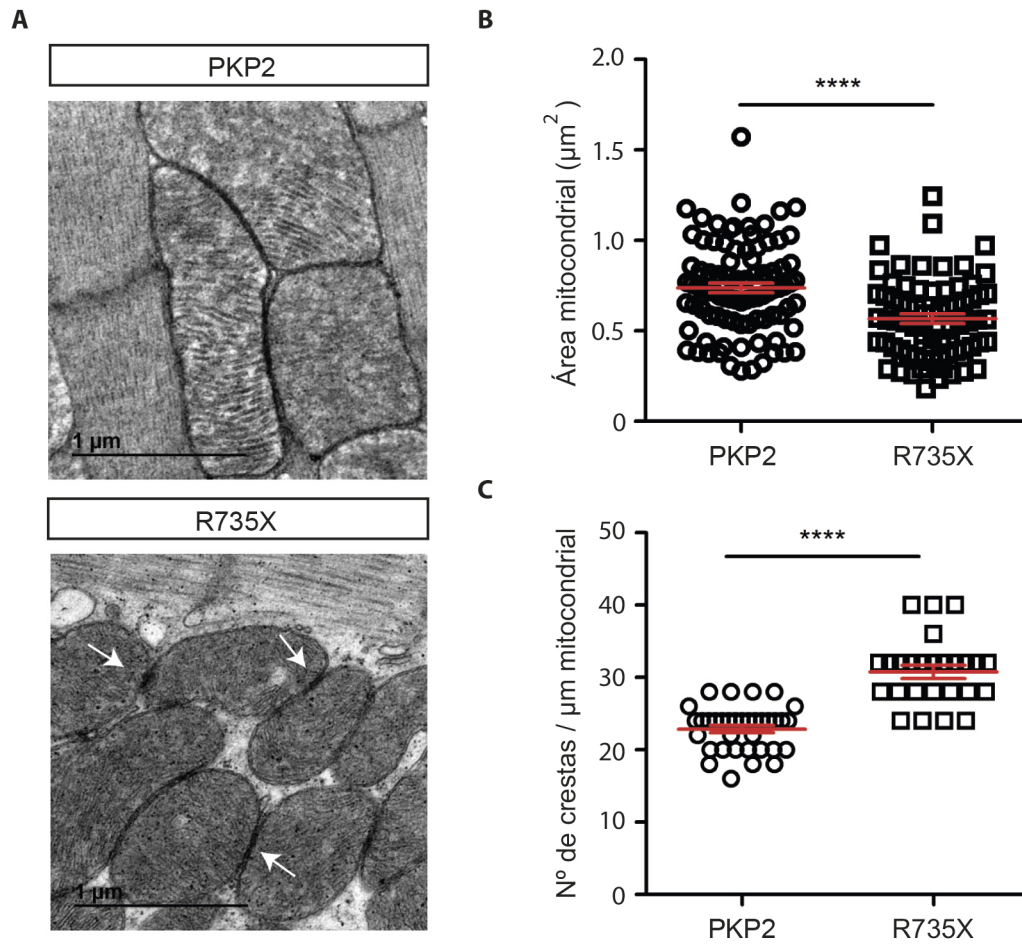
El mecanismo por el que la doxorubicina induce la cardiotoxicidad no está claro, y existen varias hipótesis que tratan de explicar su efecto específico sobre el cardiomiocito. Una de estas hipótesis plantea que el tratamiento induce el malfuncionamiento de las mitocondrias, la acumulación de hierro y la superproducción de moléculas oxidantes (ROS, del inglés “reactive oxygen species”). Por esta razón, analizamos la estructura de las mitocondrias en imágenes de microscopia electrónica de transmisión de cardiomiocitos de VD. En animales que expresan la proteína R735X existen cambios en la organización de las mitocondrias a lo largo de los sarcómeros tras la administración de doxorubicina comparados las muestras de animales PKP2 silvestre (Figura 23A). Los puntos de unión entre mitocondrias adyacentes se ven reducidos ( $18,6 \pm 9,88\%$  respecto a los  $37,53 \pm 14,06\%$  en animales silvestres; \*\*\*\* $p < 0.001$ ; Figura 23B), medido en función de la superficie de interacción entre mitocondrias. Esto también lleva asociada una disminución en la comunicación de crestas entre mitocondrias adyacentes en corazones portadores AAV-R735X comparado con los animales inyectados con AAV-PKP2 control (Figura 23C).

No sólo se observan cambios en la distribución, sino que también se observan alteraciones en la estructura de las mitocondrias a lo largo de todo el tejido cardíaco de animales R735X tratados (Figura 24A).

El área de las mitocondrias se reduce con respecto a las mitocondrias de animales PKP2 silvestres ( $0,56 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$  versus  $0,74 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$  respectivamente, \*\*\*\* $p < 0.001$ ; Figura 24B). Estas mitocondrias más pequeñas también son mas electrodensas, esto se corresponde con un mayor número de crestas mitocondriales por unidad de superficie. En mitocondrias de animales mutantes tratados el número de crestas aumenta un 50% con respecto a las mitocondrias de animales control ( $30,7 \pm 4,6$  crestas por  $\mu\text{m}^2$  de versus  $22,8 \pm 3$  crestas/ $\mu\text{m}^2$  respectivamente, \*\*\*\* $p < 0.001$ ; Figura 24C).



**Figura 23. Análisis estructural de mitocondrias tras el tratamiento con doxorubicina** **A)** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de la disposición mitocondrial a lo largo de los sarcómeros. Nótese la desorganización mitocondrial en animales portadores de la mutación. Barra=2 µm. **B)** Porcentaje de perímetro de mitocondria que establece puntos de contacto; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **C)** Alteraciones en la comunicación intermitocondrial. Se aprecia un normal acoplamiento entre crestas de mitocondrias adyacentes en animales silvestres. Sin embargo, se observa una desorganización en animales portadores de la mutación R735X. Barra=1 µm.

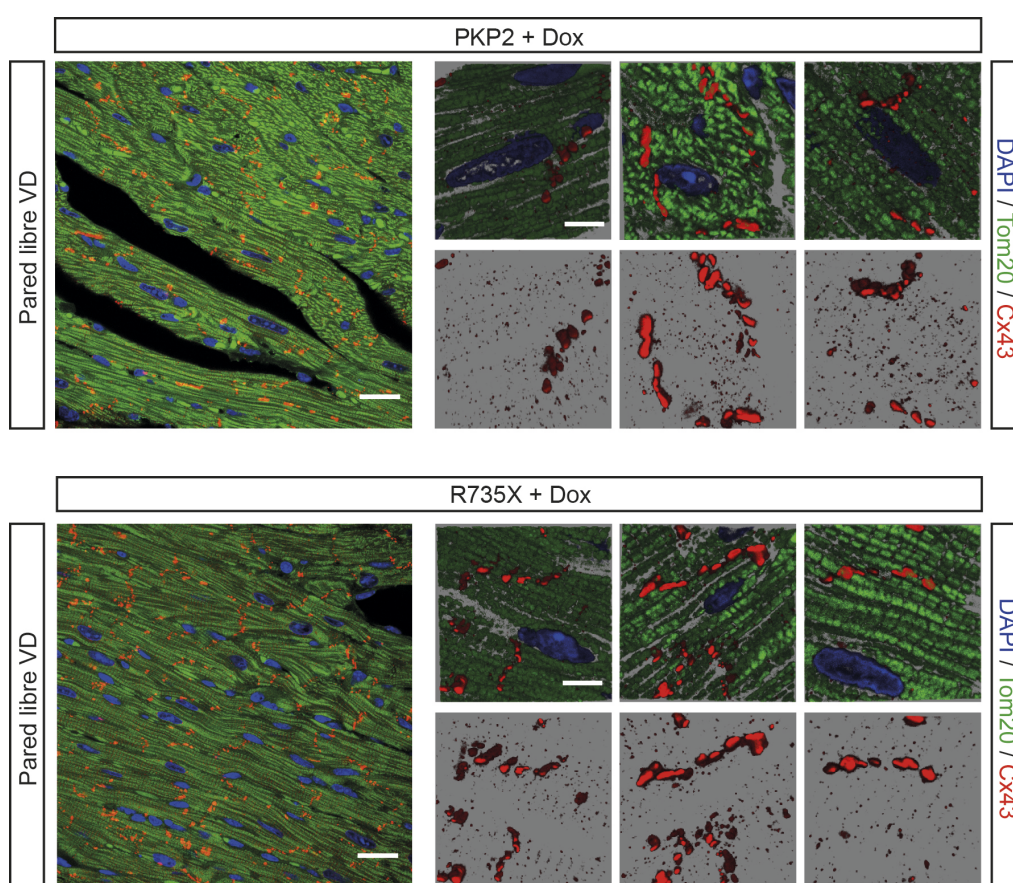


**Figura 24. A)** Imágenes representativas de mitocondrias mediante de microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican los puntos IMJ. Barra=1  $\mu\text{m}$ . **B)** Tamaño mitocondrial. Se observa una reducción en el área de mitocondrias de animales portadores de la mutación tras el tratamiento con doxorubicina.; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **C)** Análisis del número de crestas mitocondriales por micra de longitud Se observa una mayor densidad en corazones portadores de la mutación; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



PKP2 no se localiza en la mitocondria, pero si interacciona con Cx43 que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Como ya hemos demostrado anteriormente, la localización de Cx43 se ve alterada por la presencia de R735X en condiciones de ejercicio extremo. Por esta razón, hipotetizamos que la localización mitocondrial de Cx43 en animales que expresan la proteína mutante R735X tras tratamiento con Dox puede estar alterada. Así, analizamos muestras de corazones tratados por microscopia confocal de alta resolución y estudiamos la localización de Cx43 en relación con las mitocondrias (Tom20).

Las imágenes muestran una reducción en la cantidad de CX43 que se observa entre las mitocondrias de los cardiomiocitos (Figura 25). Estos datos sugieren que la presencia del mutante de PKP2 R735X altera la acumulación de Cx43 mitocondrial y en consecuencia podría ser la responsable de los cambios estructurales y de conectividad que observamos en muestras de mitocondrias por microscopia electrónica.



**Figura 25. Distribución de la proteína Cx43 en los discos intercalares y mitocondrial (mtCx43).** A) Análisis por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal de corazones transducidos y tratados con doxorubicina mostrando la localización de Cx43 (rojo) y la proteína mitocondrial Tom20 (verde). La tinción 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) fue usada para detectar núcleos celulares. Nótese en los discos intercalares la disposición de Cx43 (señal más intensa) y una reducción de la mtCx43 (punteado más fino). Barra de error= 20 y 10  $\mu$ m.





## *DISCUSIÓN*



La arritmia de ventrículo derecho (ARVC) es una enfermedad genética con alto riesgo de sufrir arritmias de origen ventricular, fallo cardíaco y en último caso muerte súbita (SCD)<sup>1</sup>. Debido a que el desarrollo y progresión de la enfermedad es tremendamente variable incluso entre individuos con la misma mutación, es muy difícil predecir que individuos están en riesgo de sufrir un episodio de arritmia o SCD. Para lograr este objetivo, se necesitan nuevas estrategias que permitan estudiar y entender mejor la interacción entre los genes mutantes y los modificadores externos que determinan el desarrollo de ARVC. En esta tesis hemos usado una aproximación nueva y original usando vectores adeno asociado (AAV) para estudiar el impacto de modificadores externos (ejercicio y cardiotóxico) en animales que expresan de forma selectiva en corazón la proteína PKP2 humana silvestre o mutada (R735X).

Establecemos y validamos que se pueden generar y estudiar durante largos periodos de tiempo modelos de ratón con una cardiomiopatía de herencia autosómica dominante, como ARVC, a partir de una única inyección de AAV en animales silvestres, sin necesidad de generar una colonia transgénica. Creemos que esta nueva estrategia puede convertirse en una herramienta muy útil para demostrar la asociación entre la expresión proteínas mutantes y el desarrollo de una patología. Pensamos que esta aproximación para evitar generar colonias de animales transgénicos, no solo podría utilizarse en cardiomiopatías con herencia autosómica dominante, sino también en cualquier otra patología que esté provocada por la expresión de un mutante dominante negativo.

Más allá de este ejemplo particular de expresión de versiones de la proteína desmosomal PKP2, esta metodología de transferencia usando vectores AAV representa una oportunidad sin precedentes para generar modelos animales con enfermedades monogénicas. Nuestra aproximación metodológica ofrece simplicidad, rapidez y potencialmente la posibilidad de aplicarla a cualquier especie experimental animal, incluyendo animales grandes. Además, poder generar animales transgénicos mediante el uso directo de vectores AAV reduce el número de animales experimentales. El hecho de que es suficiente una única inyección intravenosa para generar el modelo patológico a partir de animales silvestres, evita la necesidad de generar o establecer una colonia de animales transgénicos. Esto refuerza el principio de las 3R de Russel y Burch<sup>96</sup> en favor del uso racional de animales de experimentación: reemplazo, reducción y refinamiento.

Los principales resultados obtenidos durante esta tesis son:

1. Una sola inyección en ratones silvestres con virus AAV serotipo 9 que expresan genes bajo un promotor de cardiomiocitos (cTnT) permite la expresión homogénea del transgen durante más de 10 meses.
2. La proteína mutante R735X funciona como dominante-negativo, es decir, induce ARVC independiente a la expresión de la forma silvestre de PKP2
3. A pesar de la expresión del mutante R735X mediada por AAV no produce fenotipo de ARVC en ratones sedentarios, el ejercicio dispara la enfermedad dando lugar no solo a una disfunción del ventrículo derecho, sino también a la deslocalización de la proteína Cx43 en los cardiomiocitos (evidencias histológicas).
4. PKP2 silvestre ayuda a mantener la integridad de las conexiones mitocondriales tras tratamientos con doxorubicina.
5. El daño cardiotoxico en animales que expresan la proteína mutante R735X correlaciona con alteraciones anatómicas del ventrículo derecho, similares a lo que ocurre en pacientes con ARVC.

Usar una herramienta típica de terapia génica con un enfoque alternativo, nos ha permitido por primera vez poder desarrollar y estudiar un modelo de cardiomiopatía de origen genético. Hemos podido evaluar el efecto de una mutación específica y el efecto de potenciales modificadores externos, en este caso ejercicio extremo y cardiotoxicos. Esta estrategia, nos permitirá usar este modelo de AAV-R735X para estudiar distintas interacciones genéticas combinándolo con otros modelos de transgénicos o “knock-out” sin la necesidad de los retrocruzamientos, procesos que son tediosos, lentos, y requieren cuantiosos recursos económicos.

Durante años ha existido controversia sobre el origen de ARVC, y si el inicio de la enfermedad se produce durante el desarrollo embrionario o si por el contrario su progresión se inicia en estadios postnatales. Usando AAV para expresar R735X en animales adultos, hemos testado si la hipótesis que sostiene que individuos genéticamente predispuestos desarrollan ARVC después de la pubertad es correcta. Nuestros resultados confirman este supuesto, dando como resultado que la transferencia, por medio de AAV, de la forma dominante-negativa R735X de la proteína humana PKP2a interfiere con la versión silvestre de dicha proteína codificada en el genoma del ratón. Esta interferencia con la versión silvestre da como resultado una disfunción dependiente de ejercicio, o daño cardíaco del ventrículo derecho similar a la de los pacientes con ARVC.

---

Es frecuente que pacientes con ARVC presenten una disfunción del ventrículo derecho (VD) sin afectar al ventrículo izquierdo (VI), aunque las bases moleculares de esta diferencia se desconocen. Aun así, los síntomas de ARVC puede variar dependiendo de diferentes circunstancias como por ejemplo de la proteína desmosomal afectada. Así, la disrupción de la unión de filamentos intermedios, por mutaciones en desmoplaquina (DSP) generan también un daño severo en el VI<sup>95</sup>; mientras síntomas asociados a mutaciones en PKP2 son los clásicos de la ARVC, donde el ventrículo más afectado es siempre el VD<sup>41</sup>. Algunos de los factores físicos que pueden hacer más vulnerable el VD al sufrir daños en las adhesiones intercelulares entre cardiomiocitos, incluirían la diferencia de grosor en la pared, la resistencia a la distensión a la que están sometidos y las variaciones en la precarga. De hecho, hay estudios que demuestran reducción en la función del VD en relación con la intensidad del ejercicio. Así, vinculan el ejercicio intenso durante largos periodos de tiempo con disfunción ventricular y la predisposición a eventos arritmogénicos. Es más, algunos estudios sugieren que la disfunción del VD puede volverse permanente en algunos atletas con una trayectoria larga en competiciones. La poscarga del VD y la resistencia vascular pulmonar, las cuales son bajas en reposo, pueden producir un incremento en la presión de la arteria pulmonar durante el entrenamiento que mantiene la pared del VD bajo más presión que la del VI. Al contrario que la disfunción ventricular transitoria que ocurre en atletas de deportes de resistencia, la disfunción del VD pacientes con ARVC degenera con el tiempo y no mejora. En principio, en pacientes con ARVC el ejercicio tiene un impacto mayor en el VD comparado con el izquierdo si las mutaciones en el desmosoma, simplemente, producen una desventaja mecánica en los que componen la pared. Este efecto predominante sobre el VD se puede observar por ejemplo en un modelo de ratones heterocigotos para placoglobina (JUP)<sup>48</sup>. Estos animales desarrollan una disfunción del VD y la aparición de arritmias cuando se someten a ejercicio, demostrando que el entrenamiento acelera el desarrollo de ARVC. Otra característica importante del desarrollo de la disfunción ventricular de animales heterocigotos para JUP después de ejercicio, al igual que ocurre en animales que expresan R735X, es la ausencia de fibrosis o infiltración fibroadiposa que se observa en algunos pacientes con ARVC. Estos resultados indican que el mecanismo por el cual se desarrolla disquinesia local y se reduce la fracción de eyección en el VD es diferente al mecanismo por el cual se induce la deposición de colágeno y la sustitución fibroadiposa que aparece en estadios tardíos de pacientes con ARVC.

El ejercicio extremo aumenta el riesgo de desarrollar una disfunción en el VD en ratones que expresan R735X unas 5 veces comparado con animales control. Existen evidencias que indican que los discos intercalares entre cardiomiocitos forman una unidad funcional en donde los complejos macromoleculares interactúan para sincronizar el tejido. Por ejemplo, esta clase de interacciones entre desmosomas y “gap junctions”, se apoya en que la conexión funcional puede

ser posible gracias a interacciones entre proteínas de estos dos complejos, lo cual daría una posible explicación al fenotipo de ARVC<sup>89</sup>. PKP2, además de formar parte del desmosoma, también se encuentra en otras estructuras de unión<sup>33</sup>, interaccionando con la proteína de “gap junction” Cx43 a través de su extremo amino terminal<sup>97</sup>. Nuestros datos confirman esta interacción y demuestran que una expresión en trans del mutante R735X en tejido cardíaco puede alterar el patrón de localización celular de la proteína Cx43. En algunos pacientes con ARVC con mutaciones en PKP2 también se ven niveles anormales de la proteína Cx43 además de una deslocalización de la misma en los discos intercalares entre cardiomiocitos<sup>98</sup>. Todo ello es consistente con la conservación evolutiva de estas estructuras desmosomales a lo largo de la evolución de vertebrados.

Durante el ejercicio, las cámaras derechas del corazón son sometidas a una continua variación de la precarga cardíaca y su consiguiente estiramiento. Estas fuerzas pueden llevar a la sobreexpresión de las proteínas de unión, como pueden ser placoglobina, desmoplaquina, N-caderina y Cx43<sup>99</sup>. El estiramiento del tejido cardíaco debido al ejercicio tiene un efecto mayor sobre el VD debido a la estrechez de su pared libre, y puede llegar a ser patológico en personas con una predisposición genética ya que pueden llegar a perder la integridad estructural del tejido. Nuestro estudio demuestra que en ratones que expresan R735X y que están sometidos a ejercicio, a pesar de tener unos niveles normales del mRNA de Cx43, tienen una distribución celular anormal de dicha proteína. Estos hallazgos apoyan el modelo de unidad funcional de los discos intercalares, donde una respuesta anormal de estas estructuras durante el ejercicio puede generar cambios patológicos irreversibles. Cambios en estas uniones también afectan a la actividad los canales iónicos, por ejemplo, la pérdida de expresión de PKP2 hace que baje la corriente de sodio, lo cual lleva a una bajada en la velocidad de conducción y hace que el cardiomiocito ventricular sea más proclive a las arritmias<sup>99</sup>. Por todo ello, los pacientes que se encuentran en los primeros estadios de ARVC tienen riesgo de sufrir arritmias que les pudiera producir la muerte, incluso en ausencia de cambios estructurales y/o histológicos<sup>42</sup>.

Distintos estudios sostienen que el origen de la infiltración fibroadiposa y/o la dilatación del VD que se observa en pacientes con ARVC se inicia por la muerte del cardiomiocito. El espacio de esta célula muerta se ocupa por otro tipo celular o matriz extracelular. Para testar esta hipótesis indujimos cardiotoxicidad mediante un tratamiento con doxorrubicina (Dox). La Dox pertenece a la familia de antraciclinas que se utilizan como anticancerígeno en clínica. Este compuesto genera alta cardiotoxicidad específica en los pacientes en tratamiento. La Dox causa a nivel celular un aumento en la apoptosis, necrosis, producción de ROS, disfunción mitocondrial y la concentración intracelular de calcio, y a nivel histológico fibrosis<sup>57-59</sup>. En este contexto, los desmosomas son uno

---

de los principales mecanismos de unión en el tejido cardíaco, esenciales para mantener la estructura<sup>35</sup>, así mutantes en estas proteínas presentan dilatación ventricular<sup>21,34,100,101</sup>. Nuestros datos indican que la expresión de la versión R735X de PKP2 resulta en el desarrollo de un fenotipo ARVC después de 2 semanas de tratamiento con Dox, y presenta una dilatación, con disminución en el grosor, de la pared libre del VD. Aun así, el análisis histológico muestra de nuevo una ausencia de reemplazamiento fibrótico o graso, como ocurre en algunos pacientes con ARVC. En conjunto, esto indica que la dilatación que se observa en el VD no está debido a la sustitución fibrótica que pudiera estar mediada por el tratamiento con Dox.

El análisis de desmosomas mediante microscopía electrónica de transmisión de animales tratados con Dox y portadores de la mutación R735X mostraba una placa densa desorganizada respecto a la versión silvestre, con aumento en los espacios intercelulares. Aunque no conocemos el mecanismo por el que los desmosomas se ven afectados durante el tratamiento con Dox, la desorganización de los desmosomas parece tener su relevancia en el desarrollo de la cardiopatía dilatada. Así, la incorporación de una versión truncada de PKP2 y el daño celular mediado por la Dox podría ser una posible explicación a la dilatación observada.

Además de permitir el acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos mediante la formación de poros transmembrana, la proteína Cx43 también es un componente de varias rutas de señalización celular<sup>102,103</sup>, en concreto en el tejido cardíaco. La Cx43 influye en el metabolismo energético, la tolerancia a la isquemia y la protección frente a agentes oxidantes<sup>104,105</sup>. Varios estudios muestran la presencia de la proteína Cx43 en la membrana interna de la mitocondria (mtCx43), con una preferencia a localizar en mitocondrias subsarcoméricas respecto a las interfibrilares<sup>106,107</sup>. Los canales formados por la mtCx43 establecen puntos de unión entre las membranas internas de mitocondrias adyacentes que aseguran el acoplamiento funcional<sup>108</sup>. Modelos de isquemia-reperfusión o una inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante fármacos demuestran un relevante papel para la mtCx43 en la protección del cardiomiocito frente a un estrés oxidativo<sup>105,109,110</sup>. Estudios recientes han demostrado que estos acoplamientos funcionales permiten al cardiomiocito disipar el daño causado por la Dox, siendo vitales para una beneficiosa respuesta celular<sup>111</sup>. La mtCx43 es responsable de amortiguar el daño celular causado por la Dox, adquiriendo un papel cardioprotector mediante la reducción en los niveles de ROS tanto en la mitocondria como en el citosol, además de reducir los procesos de apoptosis mediados por una sobre carga de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la mitocondria o la despolarización de la membrana que lleva a una liberación del citocromo c al citosol<sup>111</sup>. Por tanto, alterar la localización/función de la mtCx43 perjudicaría directamente al metabolismo celular durante un estrés químico inducido, con resultados patológicos como los observados. Nuestros datos de microscopía de superresolución

indican la presencia de mtCx43 en mitocondrias interfibrilares, contrario a lo descrito hasta la fecha<sup>112</sup>. Además, la expresión de la versión mutante R735X de Pkp2 resulta en una deslocalización de la proteína mtCx43, que podría afectar al desacoplamiento mitocondrial observado. Este desacoplamiento otorgaría a la célula una desventaja funcional a la hora de amortiguar el daño mediado por la Dox, pudiendo ser una explicación al fenotipo observado.

Estudios recientes sugieren que existe información a nivel subcelular que se puede transferir entre mitocondrias anexas. En estos trabajos se muestra como existe una continuidad y coordinación de crestas mitocondriales en estructuras especializadas denominadas uniones intermitocondriales (IMJ, del inglés “inter mitochondrial junctions”)<sup>113</sup>. Aunque no se conoce la función exacta de estas IMJs, una posibilidad es que las IMJs funcionen como canales de iones, que permitan acoplar gradientes eléctricos entre mitocondrias yuxtapuestas, y así aumentando la eficacia bioenergética entre grupos de mitocondrias. En este sentido, que las crestas mitocondriales se alineen entre mitocondrias vecinas tiene su relevancia fisiológica, ya que, a diferencia de otros iones y moléculas, el potencial electroquímico que se genera en las invaginaciones de las crestas se distribuye de manera homogénea a lo largo de todo el orgánulo.

La estructura de las crestas influye directamente a la capacidad respiratoria de la mitocondria y su respuesta a señales apoptóticas<sup>113</sup>. Así, la regulación de la organización de las crestas y la coordinación intermitocondrial podría, en teoría, afectar a la función mitocondrial. Además de poder aumentar las funciones relacionadas con la fosforilación oxidativa y el manejo del calcio, las conexiones IMJs asegura que el sistema esté completamente acoplado y pueda responder de manera más eficiente<sup>113</sup>. La presencia R735X afecta al número de conexiones IMJs y a la densidad de crestas, lo que sugiere que PKP2 podría tener un papel en la formación de estas uniones y en la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos adultos. Ya que Cx43 es un integrante de la membrana mitocondrial es posible que la deslocalización que genera R735X en CX43 en condiciones de estrés también altere la estructura de crestas y IMJs en mitocondria.

Para poder estudiar a nivel de órgano el fenotipo asociado a la expresión de los mutantes de PKP2 y su interacción con el ejercicio, se hicieron mediciones electrocardiográficas de superficie en los ratones que habían sido entrenados y en animales con más de 10 meses en condiciones sedentarias. La QRS estaba alargada en los animales que expresaban la forma mutada de PKP2 en comparación con los controles, independientemente de si hacían o no ejercicio. La prolongación de QRS es frecuente en los pacientes con ARVC<sup>9,10</sup>, y estas anomalías electrocardiográficas son uno de las primeras características de la evolución de la enfermedad<sup>8</sup>. En este sentido, se ha demostrado que PKP2 y el canal de sodio (Nav1.5) están en el mismo

---



complejo molecular, y que la disfunción del primero altera las propiedades de la corriente de sodio, lo que lleva a una bajada en la velocidad de conducción<sup>99</sup>. De todas maneras, serán necesarios más estudios para confirmar la asociación de la expresión del mutante de PKP2 con las propiedades del canal de sodio.

Los defectos en el tráfico de proteínas de los discos intercalares son cruciales para el daño del cardiomiocito y el desarrollo de las anomalías eléctricas en las cardiomiopatías arritmogénicas<sup>45</sup>. Hemos demostrado que la expresión del dominante-negativo R735X de PKP2 induce alteraciones en la localización y distribución de la proteína Cx43, lo cual podría ser el origen del desarrollo de la enfermedad. En un modelo de haploinsuficiencia de Pkp2 los cardiomiocitos no muestran ninguna alteración en las proteínas de los discos intercalares, a pesar de que si presentan una disfunción del canal de sodio. Estos datos sugieren que el mecanismo de la enfermedad ARVC difiere dependiendo de las distintas mutaciones en el mismo gen, el cual puede funcionar como una proteína dominante-negativa o como haploinsuficiencia. Todo ello puede llevar a la variabilidad de la penetrancia de esta enfermedad.

## Implicaciones Clínicas

La falta de modelos animales que permiten evaluar como contribuyen diferentes mutaciones en proteínas desmosomales en el desarrollo de ARVC es una de las mayores limitaciones en el estudio de esta patología. Hasta la fecha se han descrito más de 160 mutaciones en el gen de *PKP2*, lo que conlleva la necesidad de distinguir entre las mutaciones potencialmente patológicas y aquellas inocuas. Esto es especialmente importante para pacientes con ARVC, ya que a los portadores de mutaciones en genes que codifican proteínas desmosomales se les aconseja reducir drásticamente el ejercicio y retirarse de cualquier competición atlética. Las consecuencias de una clasificación errónea son mayores para un atleta profesional, el cual puede perder toda su carrera profesional. Nuestros datos sugieren que los portadores de la mutación R735X del gen *PKP2* (c.2203C>T) deberían dejar el deporte de competición para prevenir el desarrollo de ARVC, y no deberían recibir quimioterapia que implique antracíclicos que dañen el tejido cardíaco. En conjunto nuestro trabajo sugiere que esta plataforma para testar el efecto del ejercicio sobre mutaciones concretas de PKP2 serviría para distinguir mutaciones latentes causantes de la enfermedad de aquellas que son solo polimorfismos no patológicos.



## *CONCLUSIONES*



1. Los virus adeno-asociados (AAV) pueden ser utilizados para la generación modelos enfermos con herencia dominante negativo a partir de animales silvestres sanos.
  2. La infección es homogénea, con una distribución aleatoria en mosaico, e infectando el  $95 \pm 2\%$  del tejido cardíaco.
  3. Infección mediante AAV proporciona elevadas expresiones del *transgen* de Pkp2 y su variante mutante R735X a largo plazo sin alterar los niveles endógenos de Pkp2
  4. La introducción de la variante mutante de Pkp2 R735X en ratones resulta en el desarrollo de un fenotipo de ARVC dependiente de ejercicio.
  5. La versión mutante no altera la función desmosomal: los espacios intercelulares permanecen constantes, al igual que las proteínas placoglobina y la versión endógena de Pkp2, comparada con los controles
  6. El ejercicio provoca la deslocalización de la proteína de unión conexina 43 (Cx43) en el extremo de los cardiomiocitos en animales portadores de la mutación.
  7. El aumento en el segmento QRS del electrocardiograma podría indicar estadios iniciales en posibles enfermos de ARVC.
  8. La mutación funciona como una variante dominante negativa.
  9. Este novedoso sistema de introducción de mutaciones en animales silvestres tiene un amplio potencial para estudiar las implicaciones en diversas mutaciones en cardiomiopatías complejas
  10. La generación de modelos animales enfermos mediante el uso de AAV en un escenario de herencia autosómica dominante es un método sencillo, rápido y barato, comparado con los actuales métodos de generación de colonias transgénicas.
-



## *BIBLIOGRAFÍA*





1. Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988;318:129–33.
2. Basso C, Corrado D, Thiene G. Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. *Cardiol Rev.* 1999; 7:127-35.
3. Maron BJ. Medical progress: Sudden death in young athletes. *N Engl J Med.* 2003;349:1064-75.
4. Epstein SE, Maron BJ. Sudden death and the competitive athlete: Perspectives on preparticipation screening studies. *J Am Coll Cardiol.* 1986;7:220-30.
5. Fontaine G, Guiraudon G, Frank R. Stimulation studies and epicardial mapping in VT: Study of mechanisms and selection for surgery. En: Hulbertus HE, editor. *Reentrant arrhythmias*. Lancaster, PA: MTP Publishers, 1977; 334-350.
6. Marcus FI, Fontaine G, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgogeat Y. Right ventricular dysplasia: a report of 24 cases. *Circulation* 1982; 65: 384-399.
7. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MG, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DM, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* 2010;31(7):806-14.
8. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, Karin Arndt A, Adams E, Liu Z, James CA, Judge DP, Calkins H, Churko J, Wu JC, MacRae CA, Kleber AG, Saffitz JE. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2014;6(240):240ra74.
9. te Riele AS, Bhonsale A, James CA, Rastegar N, Murray B, Burt JR, Tichnell C, Madhavan S, Judge DP, Bluemke DA, Zimmerman SL, Kamel IR, Calkins H, Tandri H. Incremental value of cardiac magnetic resonance imaging in arrhythmic risk stratification of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1761–9.

10. e Riele AS, James CA, Rastegar N, Bhonsale A, Murray B, Tichnell C, Judge DP, Bluemke DA, Zimmerman SL, Kamel IR, Calkins H, Tandri H. Yield of serial evaluation in at-risk family members of patients with ARVD/C. *J Am Coll Cardiol* 2014;64: 293–301.
  11. Nasir K1, Bomma C, Tandri H, Roguin A, Dalal D, Prakasa K, Tichnell C, James C, Spevak PJ, Marcus F, Calkins H. Electrocardiographic features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to disease severity: a need to broaden diagnostic criteria. *Circulation*. 2004 Sep 21;110(12):1527-34.
  12. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomström- Lundquist C, Fontaine G, Camerini F. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 71: 215- 218.
  13. Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, McKenna WJ, Nava A, Thiene G, Wichter T. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: need for an international registry. Study Group on Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy of the Working Groups on Myocardial and Pericardial Disease and Arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. *Circulation* 2000;101:101-6.
  14. Okabe M, Fukuda K, Nakashima Y, Arakawa K, Kikuchi M. An isolated left ventricular lesion associated with left ventricular tachycardia-arrhythmogenic «left» ventricular dysplasia? *Jpn Circ J* 1995;59:49-54.
  15. Shrapnel M, Gilbert JD, Byard RW. Arrhythmogenic left ventricular dysplasia and sudden death. *Med Sci Law* 2001;41:159-62.
  16. Laurent M, Descaves C, Biron Y, Deplace C, Almange C, Dau- bert JC. Familial occurrence of right ventricular dysplasia. *Am Heart J* 1987; 113: 827-829.
  17. Rampazzo A, Nava A, Danieli GA, Buja G, Daliento L, Fasoli G, Scognamiglio R, Corrado D, Thiene G. The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 959-962.
-

18. Severini GM, Krajnovic M, Pinamonti B. A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics* 1996; 31: 193-200.
19. Rampazzo A, Nava A, Erne P, Eberhard M, Vian E, Slomp P, Tiso N, Thiene G, Danieli GA. A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2.151-2.154.
20. Groeneweg JA, van der Zwaag PA, Olde Nordkamp LR, Bikker H, Jongbloed JD, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Cox MG, van der Heijden JF, Atsma DE, de Boer K, Doevendans PA, Vink A, van Veen TA, Dooijes D, van den Berg MP, Wilde AA, van Tintelen JP, Hauer RN. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to revised 2010 Task Force criteria with inclusion of non-desmosomal phospholamban mutation carriers. *Am J Cardiol* 2013;112:1197–206.
21. Delmar M, McKenna WJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res* 2010;107(6):700-14.
22. Rizzo S, Pilichou K, Thiene G, Basso C. The changing spectrum of arrhythmogenic (right ventricular) cardiomyopathy. *Cell Tissue Res* 2012; 348:319–23.
23. Marcus FI, Edson S, Towbin JA. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a practical guide for physicians. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1945–8.
24. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 2001;10:189-94.
25. Marks AR, Priori S, Memmi M, Kontula K, Laitinen PJ. Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cell Physiol* 2002;190:1-6.
26. Stokes DL, Wagenknecht T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* 2000;267:5274-9.

27. Tunwell RE, Wickenden C, Bertrand BM, Shevchenko VI, Walsh MB, Allen PD, Lai FA. The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem J* 1996;318:477-87.
  28. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000;101:365-76.
  29. Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, Bauce B, Carraro G, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA, Rampazzo A. Regulatory mutations in transforming growth factor - beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 2005;65:366-73.
  30. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, W, Gallagher B, Morris-Larkin L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet.* 2008;82:809-21.
  31. Quarta G, Syrris P, Ashworth M, Jenkins S, Zuborne Alapi K, Morgan J, Muir A, Pantazis A, McKenna WJ, Elliott PM. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2011. 33(9):1128-36.
  32. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, Brun F, Pinamonti B, Salcedo EE, Sauer W, Pyxaras S, Anderson B, Simon B, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H, Mestroni L. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation.* 2011; 124:876-85.
  33. Van Tintelen JP, Van Gelder IC, Asimaki A, Suurmeijer AJ, Wiesfeld AC, Jongbloed JD, van den Wijngaard A, Kuks JB, van Spaendonck-Zwarts KY, Notermans N, Boven L, van den Heuvel F, Veenstra-Knol HE, Saffitz JE, Hofstra RM, van den Berg MP. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm.* 2009; 6:1574-83.
-

- 
34. Mestroni L, Milasin J, Vatta M, Pinamonti B, Sinagra G, Rocco C, Matulic M, Falaschi A, Giacca M, Camerini F.. Genetic factors in dilated cardiomyopathy. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1996;89:15-20.
  35. Hertig CM, Butz S, Koch S, Eppenberger-Eberhardt M, Kemler R, Eppenberger HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. II. Spatio-temporal appearance of proteins involved in cell-cell contact and communication. Formation of two distinct N-cadherin/catenin complexes. *J Cell Sci* 1996;109:11-20.
  36. Haftek M, Hansen MU, Kaiser HW, Kreysel HW, Schmitt D. Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1996;106:498-504.
  37. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2002;71:1200-6.
  38. Syrris P, Ward D, Evans A, Asimaki A, Gandjbakhch E, Sen- Chowdhry S. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet* 2006;79:978-84.
  39. Ferreira A, Ceuterick-de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F. Desmin-related myopathy with mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein n gene. *Ann Neurol* 2004;55:676-86.
  40. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004;36:1162-4.
  41. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Wilde AA, van der Smagt J, Boven LG, Mannens MM, van Langen IM, Hofstra RM, Otterspoor LC, Doevendans PA, Rodriguez LM, van Gelder IC, Hauer RN. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113(13):1650-8.
-

42. Cox MG, van der Zwaag PA, van der Werf C, van der Smagt JJ, Noorman M, Bhuiyan ZA, Wiesfeld AC, Volders PG, van Langen IM, Atsma DE, Dooijes D, van den Wijngaard A, Houweling AC, Jongbloed JD, Jordaens L, Cramer MJ, Doevendans PA, de Bakker JM, Wilde AA, van Tintelen JP, Hauer RN. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: pathogenic desmosome mutations in index-patients predict outcome of family screening: Dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy genotype-phenotype follow-up study. *Circulation* 2011;123:2690–700.
  43. Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, Basso C, Thiene G, Tsatsopoulou A, Protonotarios N, McKenna WJ, Calkins H, Saffitz JE. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2009;360(11):1075-84.
  44. Grossmann, K.S., C. Grund, J. Huelsken, M. Behrend, B. Erdmann, W.W. Franke, and W. Birchmeier. 2004. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J. Cell Biol.* 167:149–160.
  45. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang FX, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res* 2012;95(4):460-8.
  46. Kant S, Holthofer B, Magin TM, Krusche CA, Leube RE. Desmoglein 2-Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015 Aug;8(4):553-63.
  47. Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, et al. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm* 2004;1:3-11.
  48. Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, Witt H, Schafers M, Zellerhoff S, Paul M, Athai T, Hiller KH, Baba HA, Breithardt G, Ruiz P, Wichter T, Levkau B. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 2006;114(17):1799-806.
-

- 
49. Pilichou K, Bezzina CR, Thiene G, Basso C. Arrhythmogenic cardiomyopathy: transgenic animal models provide novel insights into disease pathobiology. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4:318–26.
  50. James CA, Bhonsale A, Tichnell C, Murray B, Russell SD, Tandri H, Tedford RJ, Judge DP, Calkins H. Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(14):1290-7.
  51. Basso C, Corrado D, Thiene G. Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. *Cardiol Rev.* 1999; 7:127-35.
  52. Sbrana F, Greco P, Rovai D. (2009). Dilated cardiomyopathy post-chemotherapy. *Recenti Prog Med.* 2009 Mar;100(3):132-6.
  53. Cecchi E, Calabretta R, Mattesini A, Gensini GF, Giglioli C. (2012). Suspected post-chemotherapy cardiomyopathy hiding severe three-vessel coronary artery disease in a young patient with metabolic syndrome: should an early angiography be recommended?. *Acta Med Iran.* 2012;50(10):707-9.
  54. Yu AF, Steingart RM, Fuster V. (2014). Cardiomyopathy Associated with Cancer Therapy. *J Card Fail.* S1071-9164(14)01129-4.
  55. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2009;9:338–50.
  56. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 2014;5:25.
  57. Pecoraro M, Sorrentino R, Franceschelli S, Del Pizzo M, Pinto A, Popolo A. Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity: Role of Mitochondrial Connexin 43. *Cardiovasc Toxicol.* 2015 Oct;15(4):366-76. doi: 10.1007/s12012-014-9305-8.
  58. Ganz, W.I., Sridhar, K.S., Ganz, S.S., Gonzalez, R., Chakko, S., Serafini, A., 1996. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Oncology* 53, 461–470.
-

59. Tjeerdsma, G., Meinardi, M.T., van Der Graaf, W.T., van Den Berg, M.P., Mulder, N.H., Crijns, H.J., de Vries, E.G., van Veldhuisen, D.J., 1999. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart* 81, 419–423.
  60. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:351–75.
  61. Khiati S, Dalla Rosa I, Sourbier C, Ma X, Rao VA, Neckers LM, et al. Mitochondrial topoisomerase I (Top1mt) is a novel limiting factor of doxorubicin cardiotoxicity. *Clin Cancer Res* 2014;20:4873–81.
  62. M.F. Xu, P.L. Tang, Z.M. Qian, M. Ashraf. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci*, 68 (2001), pp. 889–901.
  63. T. Simunek, M. Sterba, O. Popelova, M. Adamcova, R. Hrdina, V. Gersl. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*, 61 (2009), pp. 154–171.
  64. M.S. Horenstein, R.S. Vander Heide, T.J. L'Ecuyer.. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*, 71 (2000), pp. 436–444.
  65. J. Vasquez-Vivar, P. Martasek, N. Hogg, B.S. Masters, K.A. Pritchard Jr., B. Kalyanaraman. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*, 36 (1997), pp. 11293–11297.
  66. J. Nitobe, S. Yamaguchi, M. Okuyama, N. Nozaki, M. Sata, T. Miyamoto, *et al.* Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 57 (2003), pp. 119–128.
  67. H. Kappus, H. Muliawan, M.E. Scheulen. In vivo studies on adriamycin-induced lipid peroxidation and effects of ferrous ions. *Dev Toxicol Environ Sci*, 8 (1980), pp. 635–638.
  68. L.C. Papadopoulou, G. Theophilidis, G.N. Thomopoulos, A.S. Tsiftoglou. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice:
-



- suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem Pharmacol*, 57, pp. 481–489.
69. Khiati S, Dalla Rosa I, Sourbier C, Ma X, Rao VA, Neckers LM, et al. Mitochondrial topoisomerase I (Top1mt) is a novel limiting factor of doxorubicin cardiotoxicity. *Clin Cancer Res* 2014;20:4873–81.
70. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, Mutharasan RK, Naik TJ, Ardehali H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):617-30. doi: 10.1172/JCI72931. Epub 2014 Jan 2.
71. Bueler H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem* 1999;380(6):613-22.
72. Monahan PE, Samulski J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 2000; (6): 433-40.
73. Weitzman M, Kyostio S, Kotin R, Owens R. Adeno-associated virus (AAV) rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *PNAS* 1994; 91: 5808.
74. Berns KI, Giraud C. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 218: 1-23.
75. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; 63: 3822-8.
76. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76(2): 791-801.
77. Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* 2000; 74: 3852-8.
-

78. Handa A, Muramatsu S, Qiu J, Mizukami H, Brown Kevin E. Adeno- associated virus (AAV3) based vectors transduce hematopoietic cells not susceptible of transduction with AAV2 based vectors. *J Gen Virol* 2000; 81: 2077-84.
  79. Prasad KM, Xu Y, Yang Z, Acton ST, French BA. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther*. 2011; 18(1):43-52.
  80. Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, García-Prieto J, López S, Abia R, Muriana FJ, Fuster V, Ibáñez B, Bernal JA. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35(1):50-9.
  81. Bjørklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG, Bentzon JF. *Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering*. *Circ Res*. 2014;114:1684–1689.
  82. Sievers B, Addo M, Franken U, Trappe HJ. Right ventricular wall motion abnormalities found in healthy subjects by cardiovascular magnetic resonance imaging and characterized with a new segmental model. *Journal of cardiovascular magnetic resonance: official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2004;6:601-8.
  83. Bluemke DA, Krupinski EA, Ovitt T et al. MR Imaging of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: morphologic findings and interobserver reliability. *Cardiology* 2003;99:153-62.
  84. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology* 1998;72:2224-32.
  85. Hauswirth WW, Lewin AS, Zolotukhin S, Muzyczka N. Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Methods in enzymology* 2000;316:743-61.
  86. Prasad KM, Xu Y, Yang Z, Toufektsian MC, Berr SS, French BA. Topoisomerase inhibition accelerates gene expression after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the mammalian heart. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2007;15:764-71.
-

- 
87. Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M et al. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 2006;114:1799-806.
  88. Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sen-Chowdhry S, Ebrahim HY, Evans A, Hitomi N, Norman M, Pantazis A, Shaw AL, Elliott PM, McKenna WJ. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113(3):356-64.
  89. Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res* 2011;109(2):193-201.
  90. Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):1831-43.
  91. Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(1):76-82.
  92. Swope D, Cheng L, Gao E, Li J, Radice GL. Loss of cadherin-binding proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. *Mol Cell Biol.* 2012 Mar;32(6):1056-67.
  93. Li J, Swope D, Raess N, Cheng L, Muller EJ, Radice GL. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of  $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 2011 Mar;31(6):1134-44.
  94. C, Thiene G. Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Just a matter of fat? *Cardiovasc Pathol* 2005;14(1):37-41.
  95. López-Ayala JM, Gómez-Milanés I, Sánchez Muñoz JJ, Ruiz-Espejo F, Ortiz M, González-Carrillo J, López-Cuenca D, Oliva-Sandoval MJ, Monserrat L, Valdés M, Gimeno JR. Desmoplakin truncations and arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy: characterizing a phenotype. *Europace.* 2014 Dec;16(12):1838-46.
-

96. Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. Universities Federation for Animal Welfare Wheathampstead, England (reprinted in 1992).
  97. Agullo-Pascual E, Reid DA, Keegan S, Sidhu M, Fenyo D, Rothenberg E, Delmar M. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc Res* 2013;100:231-40.
  98. Yamada K, Green KG, Samarel AM, Saffitz JE. Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. *Circ Res* 2005;97:346–53.
  99. Sato PY, Musa H, Coombs W, et al. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2009;105:523–6.
  100. Toyoda Y, Okada M, Kashem MA. A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Jun;115(6):1367-73.
  101. Elliot P, O'Mahony C, Syrris P, Evans A, Rivera Sorensen C, Sheppard MN, Carr-White G, Pantazis A, McKenna WJ. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010 Aug;3(4):314-22.
  102. Pacher, P. & Hajnoczky, G. Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *EMBO J.* 20, 4107–4121 (2001).
  103. Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P. & Zorov, D. B. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 107, 481–495
  104. Denuc A, Núñez E, Calvo E, Loureiro M, Miro-Casas E, Guarás A, Vázquez J, García-Dorado D. New protein-protein interactions of mitochondrial connexin 43 in mouse heart. *J Cell Mol Med.* 2016 May;20(5):794-803.
  105. Jiang JX, Gu S. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1711: 208–14
-

- 
106. Agullo-Pascual E, Delmar M. The noncanonical functions of Cx43 in the heart. *J Membr Biol.* 2012; 245: 477–82.
107. García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 386–401.
108. García-Perez, C. *et al.* Bid-induced mitochondrial membrane permeabilization waves propagated by local reactive oxygen species (ROS) signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 4497–4502 (2012).
109. Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, González-Loyola A, *et al* Effects of substitution of Cx43 by Cx32 on myocardial energy metabolism, tolerance to ischaemia and preconditioning protection. *J Physiol.* 2010; 588: 1139–51.
110. Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, *et al* Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2005; 67: 234–44.
111. Heinzel FR, Luo Y, Li X, *et al* Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ Res.* 2005; 97: 583–6.
112. Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, *et al* Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104: 141–7.
113. Picard M, McManus MJ, Csordás G, Várnai P, Dorn GW 2nd, Williams D, Hajnóczky G, Wallace DC. Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nat Commun.* 2015 Feb 17;6:6259.
-



*PUBLICACIONES*





# Exercise Triggers ARVC Phenotype in Mice Expressing a Disease-Causing Mutated Version of Human Plakophilin-2



Francisco M. Cruz, PhD,\* David Sanz-Rosa, PhD,† Marta Roche-Molina, PhD,\* Jaime García-Prieto, BSc,† José M. García-Ruiz, MD,† Gonzalo Pizarro, MD,† Luis J. Jiménez-Borreguero, MD,† Miguel Torres, PhD,\* Antonio Bernad, PhD,\* Jesús Ruíz-Cabello, PhD,‡ Valentín Fuster, MD, PhD,†§ Borja Ibáñez, MD, PhD,†|| Juan A. Bernal, PhD\*

## ABSTRACT

**BACKGROUND** Exercise has been proposed as a trigger for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) phenotype manifestation; however, research is hampered by the limited availability of animal models in which disease-associated mutations can be tested.

**OBJECTIVES** This study evaluated the impact of exercise on ARVC cardiac manifestations in mice after adeno-associated virus (AAV)-mediated gene delivery of mutant human *PKP2*, which encodes the desmosomal protein plakophilin-2.

**METHODS** We developed a new model of cardiac tissue-specific transgenic-like mice on the basis of AAV gene transfer to test the potential of a combination of a human *PKP2* mutation and endurance training to trigger an ARVC-like phenotype.

**RESULTS** Stable cardiac expression of mutant *PKP2* (c.2203C>T), encoding the R735X mutant protein, was achieved 4 weeks after a single AAV9-R735X intravenous injection. High-field cardiac magnetic resonance over a 10-month postinfection follow-up did not detect an overt right ventricular (RV) phenotype in nonexercised (sedentary) mice. In contrast, endurance exercise training (initiated 2 weeks after AAV9-R735X injection) resulted in clear RV dysfunction that resembled the ARVC phenotype (impaired global RV systolic function and RV regional wall motion abnormalities on cardiac magnetic resonance). At the histological level, RV samples from endurance-trained R735X-infected mice displayed connexin 43 delocalization at intercardiomyocyte gap junctions, a change not observed in sedentary mice.

**CONCLUSIONS** The introduction of the *PKP2* R735X mutation into mice resulted in an exercise-dependent ARVC phenotype. The R735X mutation appears to function as a dominant-negative variant. This novel system for AAV-mediated introduction of a mutation into wild-type mice has broad potential for study of the implication of diverse mutations in complex cardiomyopathies. (J Am Coll Cardiol 2015;65:1438–50) © 2015 by the American College of Cardiology Foundation.

From the \*Cardiovascular Development and Repair Department, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; †Epidemiology, Atherothrombosis and Imaging Department, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; ‡Advanced Imaging Unit, Epidemiology, Atherothrombosis and Imaging Department, Ciber de Enfermedades Respiratorias and Universidad Complutense, Madrid, Spain; §The Zena and Michael A. Wiener Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York; and the ||Cardiovascular Institute, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the “Fondo de Investigación Sanitaria” (BFU2012-35258 grant to Dr. Bernal, Ramón y Cajal Program grant RYC-2009-04341 to Dr. Bernal, and FIS10/02268 to Dr. Ibáñez), and fellowship FPU-AP2010-5951 to Dr. Cruz. The Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the Pro-CNIC Foundation. The authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. Hugh Calkins, MD, served as Guest Editor for this article.

Manuscript received October 1, 2014; revised manuscript received January 27, 2015, accepted January 29, 2015.



**A**rrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a heart muscle disease, clinically characterized by right ventricular (RV) anatomic abnormalities and an above-normal incidence of ventricular arrhythmia that can lead to sudden cardiac death, especially in young people. Many cases involve a familial association, and several mutations have been identified (1,2).

SEE PAGE 1451

ARVC onset is unpredictable; a gene-environment interaction has been suggested to trigger the disease's anatomic/electrical development, but this proposal is still deliberated. Ventricular arrhythmias and sudden death have been linked to exercise, which led to the recommendation that patients carrying an ARVC-causing mutation withdraw from endurance exercise (3); however, the effect of exercise on the onset and development of the anatomic ARVC phenotype is strongly debated.

In most cases, ARVC first manifests, after an initial concealed phase, as areas of RV dyskinesia that develop into isolated right-sided heart dysfunction and finally biventricular failure and fibrofatty replacement of heart muscle (4). Beyond reducing the incidence of arrhythmias with antiarrhythmic drugs or an implantable cardioverter-defibrillator, no treatment can effectively prevent disease progression.

ARVC is a paradigm of a complex cardiomyopathy caused by an autosomal dominant trait (5,6). Of the 8 genes linked to ARVC (7), 5 encode desmosomal proteins and account for ~50% of ARVC probands (5). The more than 380 mutations identified in ARVC patients include 161 pathogenic variants of *PKP2*, which encodes the desmosomal protein plakophilin-2. In several series, the prevalence of *PKP2* mutations in ARVC patients was >40% (8,9). Despite the strong implication of *PKP2* mutations in ARVC, there are no available transgenic disease models that express *PKP2* mutant alleles (10).

To study the effect of exercise on hearts of mice carrying the most prevalent ARVC-associated mutation (*PKP2*), we used adeno-associated virus (AAV)-mediated *PKP2* mutant gene transfer to express an ARVC-causing mutation in the cardiomyocytes of wild-type mice. After stable expression of mutant *PKP2*, we studied RV function by high-field cardiac magnetic resonance (CMR) in sedentary and endurance-trained mice.

## METHODS

Four- to 6-week-old wild-type C57BL6/J mice were injected with  $3.5 \times 10^{10}$  viral genomes encoding

luciferase (*Luc*), wild-type human *PKP2*, or the C-terminal deletion mutant version, R735X. Animals were divided into group A (trained) and group B (sedentary). Training in group A started 2 weeks after injection and continued for 8 consecutive weeks. At the end of that period, *Luc*, *PKP2*, and R735X mice were imaged by CMR and euthanized for heart sampling. Animals in group B were analyzed by CMR 6 and 10 months after infection with AAV particles.

All CMR images were analyzed with dedicated software (QMass MR version 7.5, Medis, Leiden, the Netherlands) by 2 experienced observers blinded to the study allocation. All CMR images were of good quality and could be analyzed. The short-axis dataset was analyzed quantitatively by manual detection of endocardial borders in end diastole and end systole with exclusion of papillary muscles and trabeculae to obtain both left and right end-diastolic volume, end-systolic volume, and ejection fraction (EF). Wall motion was classified as abnormal in the presence of akinesia, dyskinesia (in ventricular systole), or bulging (in ventricular diastole).

Experiments used the minimum number of mice needed to give sufficient statistical power, and no animals were excluded from the analyses. Data were analyzed by 1-way analysis of variance, 2-way analysis of variance, and Student *t* test. Relative risk analysis was assessed by 2-tailed Fisher exact test. CMR measure reliability was assessed by interobserver intraclass correlation coefficient (absolute agreement) and mean bias.

Additional materials and methods are available in the [Online Appendix](#).

## RESULTS

We generated enhanced green fluorescence protein (EGFP)-reporter AAV vectors driven from the cardiomyocyte-specific cardiac troponin T proximal promoter and encoding *Luc*, wild-type human *PKP2a* (the major splice variant in the heart), or a C-terminal deletion *PKP2a* mutant (R735X) (Figures 1A and 1B). We chose the R735X mutation because exon 11 is a hot spot for mutations that give rise to truncated *PKP2* products found in ARVC patients (11–13) (Figure 1C). To further test whether genetic haploinsufficiency operates after expression in trans of R735X mutant, we measured the endogenous mouse *Pkp2* transcript level. In AAV-R735X transduced mice, endogenous *Pkp2* messenger ribonucleic acid (mRNA) levels remained stable (Figure 1D), which demonstrates that

## ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

**AAV** = adeno-associated virus

**ARVC** = arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy

**CMR** = cardiac magnetic resonance

**Cx43** = connexin 43

**EF** = ejection fraction

**EGFP** = enhanced green fluorescence protein

**Luc** = luciferase

**LV** = left ventricle

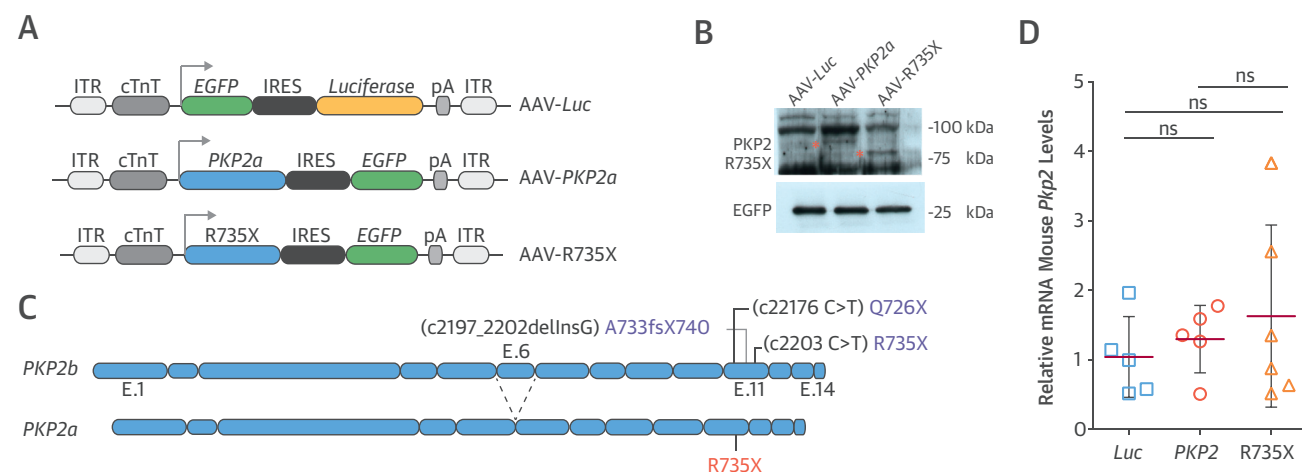
**mRNA** = messenger ribonucleic acid

**PKP2** = plakophilin-2

**R735X** = C-terminal deletion *PKP2a* mutant

**RV** = right ventricle

**FIGURE 1** AAV Construct to Express Transgenes in Cardiomyocytes



**(A)** Adeno-associated virus (AAV) vectors encoding human wild-type PKP2a or the R735X mutant variant driven by the cardiac troponin T (cTnT) proximal promoter and followed by enhanced green fluorescence protein (EGFP) after an internal ribosome entry site (IRES). In the control luciferase (*Luc*) vector, EGFP is placed after the cTnT proximal promoter, and the *Luc* follows the IRES. AAV inverted terminal repeats (ITR) and the poly-adenylation sequence (pA) are also indicated. **(B)** Western blot shows cardiac expression of PKP2a, R735X, and EGFP. Red asterisk indicates proteins encoded by the transgene. **(C)** Alignment of alternatively spliced versions of human PKP2. Exon 6 is missing in the PKP2a cardiac isoform. Nonsense mutations in PKP2b exon 11 associated with ARVC are indicated in blue (c.2176C>T, Q726X; c.2197\_2202delinsG, A733fsX740; c.2203C>T, R735X); the equivalent mutant in PKP2a (R735X) used in this study is indicated in red. **(D)** Quantitative polymerase chain reaction of hearts infected with AAV expressing *Luc*, *PKP2*, and *R735X* showing stable *Pkp2* endogenous levels. mRNA = messenger ribonucleic acid; PKP2 = plakophilin-2.

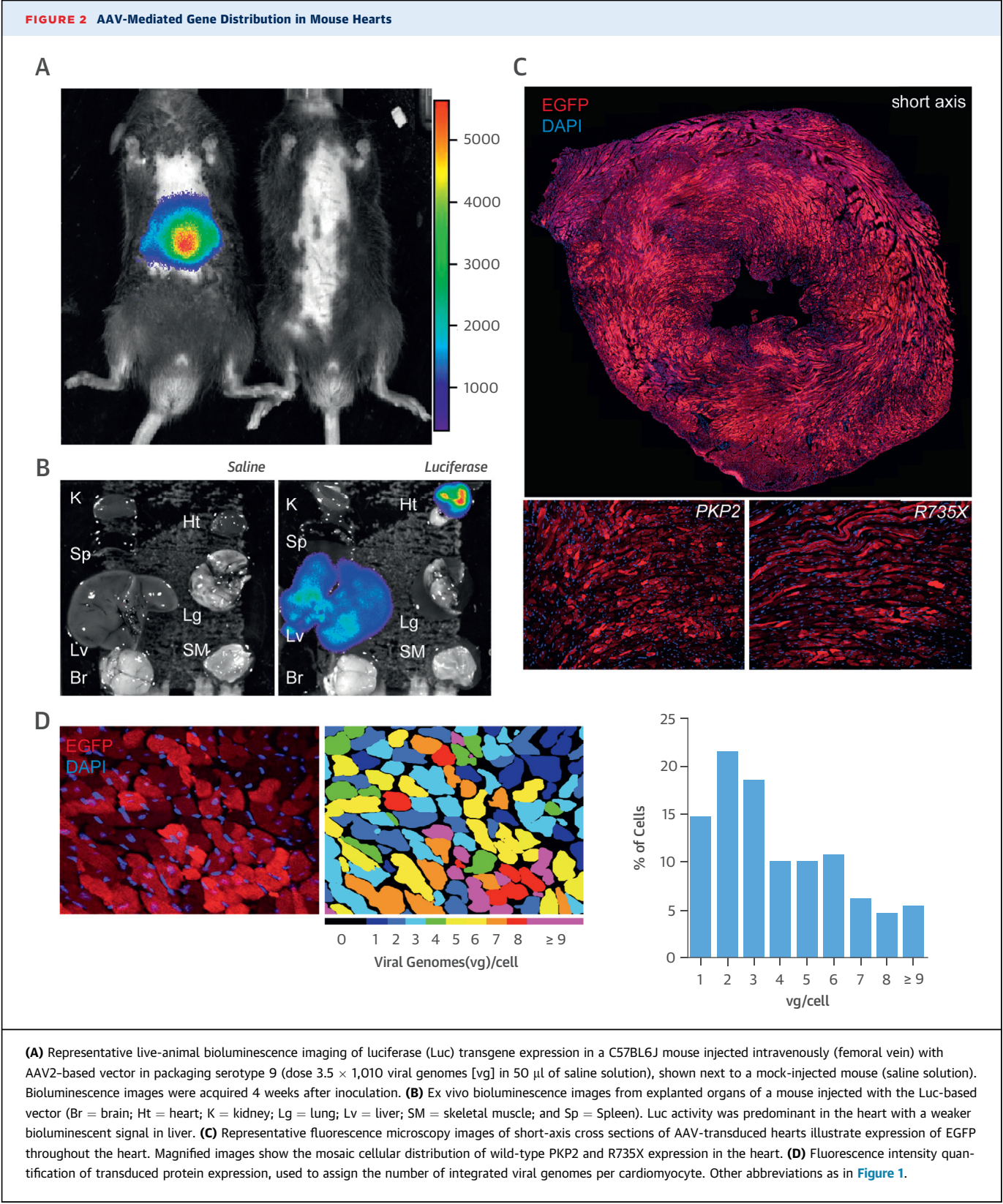
mutant R735X transcript does not induce degradation of mouse *Pkp2* messenger.

Cardiac expression was potentiated by packaging the vector in the AAV9 capsid serotype, the most efficient envelope protein for cardiomyocyte gene delivery in mice (14). Viral particles ( $3.5 \times 10^{10}$  per animal) were administered to 4- to 5-week-old mice through the intravenous femoral route. Two weeks after injection, in vivo bioluminescence signal was evident in all injected *Luc* control mice, reaching a plateau after 4 weeks (Figure 2A). Ex vivo bioluminescence imaging of organs from these mice showed that signal was present in liver and more intensely in heart (Figure 2B). Subsequent quantitative polymerase chain reaction quantification of *PKP2* and *EGFP* mRNA confirmed this expression pattern (Online Figure 1), showing 40-fold higher expression of these genes in heart than in liver. AAV9-mediated delivery of a gene driven from a cardiac-specific cardiac troponin T promoter thus preferentially produces activity in the heart after systemic intravenous administration. Further analysis demonstrated a mosaic distribution of transgene expression throughout the heart, which corresponded to a cardiomyocyte transduction rate (quantified by EGFP immunofluorescence) of  $95 \pm 2\%$  (Figure 2C). Analysis by *k*-means clustering for segmented images showed

that cell fluorescence intensities clustered around integer values, with >50% of cardiomyocytes having a signal intensity that corresponded to a viral genome number between 1 and 3 (Figure 2D). These data confirm that AAV infection occurs throughout the heart and that cardiomyocytes stably express the specific targeted transgenes.

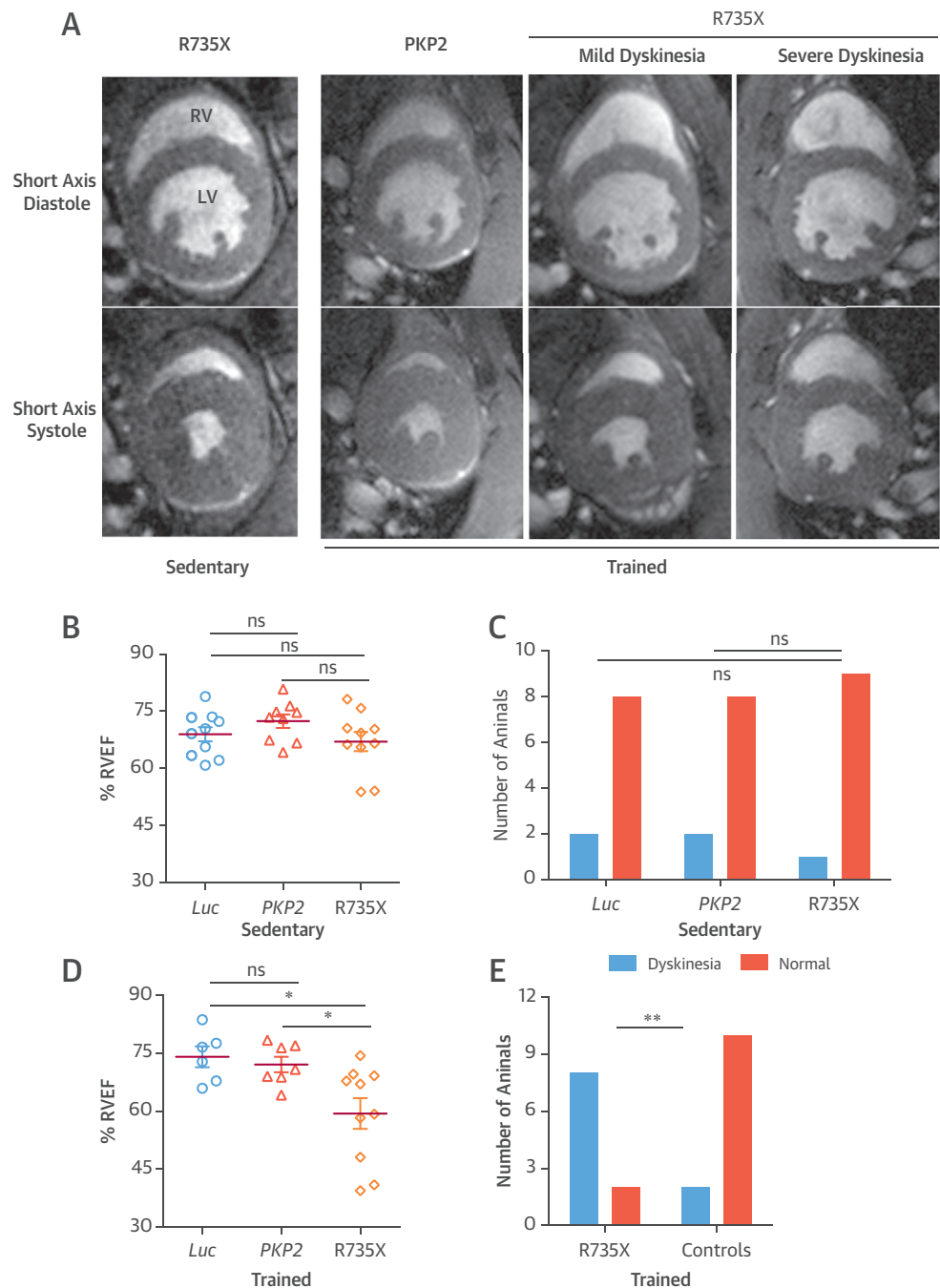
To assess the effect of transgene expression on cardiac phenotype, we evaluated typical anatomic features of ARVC in sedentary animals by high-field (7 Tesla) CMR at 10 months after AAV infection. After quantitative (RV end-diastolic volume, end-systolic volume, and EF) and qualitative (RV wall motion abnormalities) analyses, we did not find any sign of RV dysfunction in sedentary mice (Figures 3A [left panel], 3B, and 3C), despite long-term expression of transgenes in cardiomyocytes (Online Figure 2). In addition, surface electrocardiographic analysis revealed that QRS duration in AAV-R735X mice was prolonged compared with control mice that expressed wild-type PKP2 or *Luc* (Online Figure 3A).

Exercise training has been proposed to accelerate the appearance of ARVC disease features in humans (15,16) and in a plakoglobin-haploinsufficient animal model (17), although this association has not been demonstrated formally when expressing a potential





**FIGURE 3** Anatomic CMR Analysis After AAV Infection



**(A)** Representative short-axis cardiac magnetic resonance (CMR) images taken at the end of diastole and systole in mice transduced with wild-type PKP2 or the R735X mutant. The left panels show representative images of a normal heart from a 10-month-old sedentary animal transduced with AAV-R735X. Right panels show CMR images from mice infected with PKP2 or R735X virus and subjected to 8 weeks of endurance training (RV = right ventricle; LV = left ventricle). **(B)** Percent RV ejection fraction (% RVEF) in hearts of 10-month-old sedentary mice transduced with the Luc, PKP2, or R735X AAV vectors. **(C)** Incidence and relative risk of dyskinetic events in the RV wall of R735X, Luc, and PKP2-transduced mice. **(D)** Analysis as in **(B)** for 8-week exercise-trained mice; \* $p < 0.05$ . **(E)** Analysis as in **(C)** in exercise-trained R735X-transduced mice and control animals (relative risk: 4.8). \*\* $p = 0.008$  (2-tailed Fisher exact test). [Online Videos 1, 2, and 3](#) contain CMR cine images showing RV contractility. Abbreviations as in [Figure 1](#).

dominant-negative mutant. To test this hypothesis in our disease model, we subjected mice to an 8-week swimming endurance training protocol, starting 2 weeks after AAV9 injection and cardiac *trans*-expression of *Luc*, wild-type *PKP2*, or mutant *PKP2*-R735X. To evaluate the ARVC phenotype in trained animals, we specifically quantified typical anatomic disease features by high-field (7 T) CMR after 8 weeks of training (Figure 3A, right panels). These functional imaging studies revealed quantitative and qualitative RV abnormalities in mice carrying the R735X mutation after training (Figures 3D and 3E) (Online Videos 1, 2, and 3).

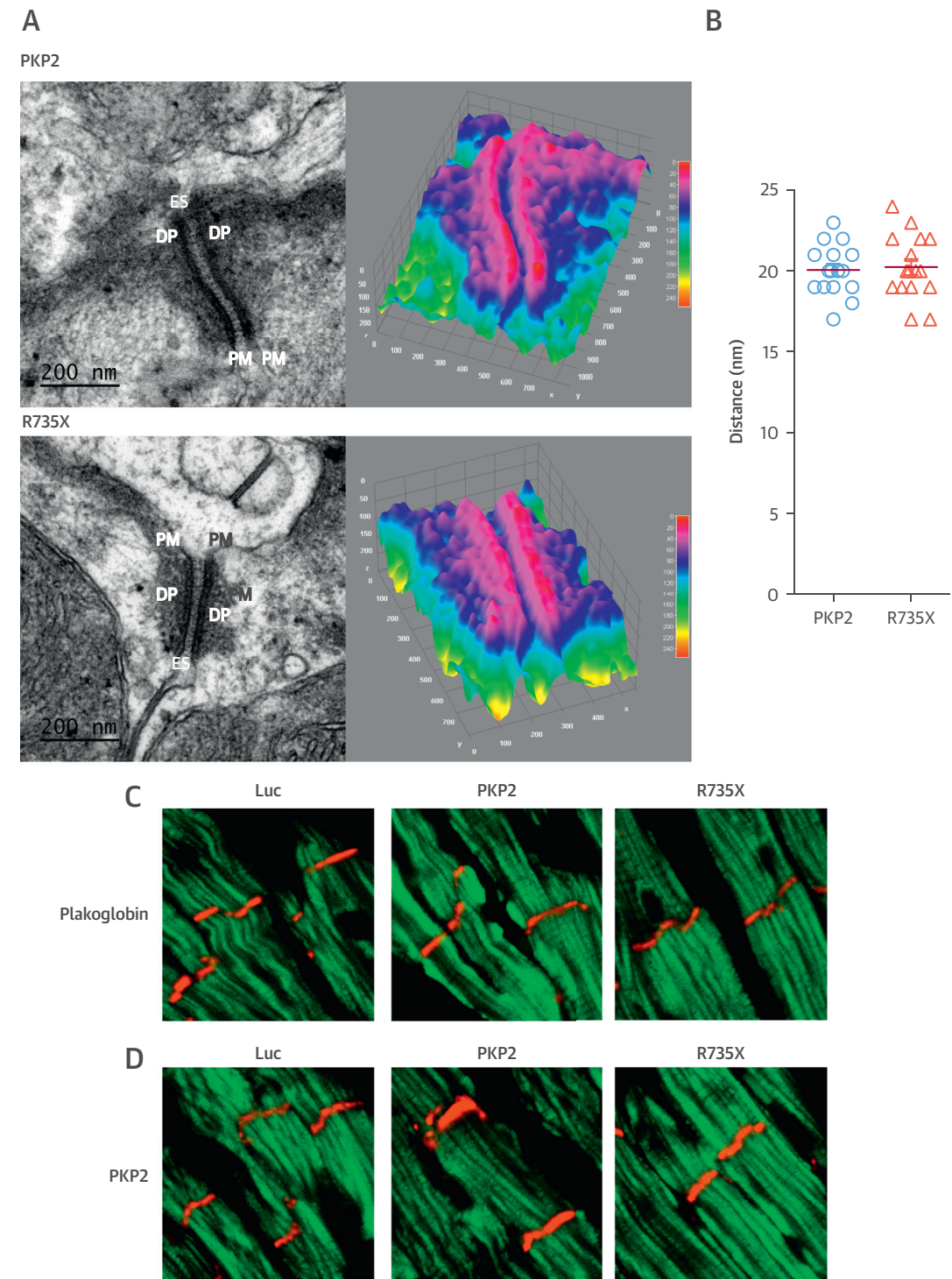
RV EF in these mice ( $59.3 \pm 3.9\%$ ;  $n = 10$ ) was lower than in mice expressing wild-type *PKP2* ( $72.4 \pm 1.9\%$ ;  $n = 6$ ) or *Luc* ( $74 \pm 2.7\%$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 3D). Contrary to trained mice, sedentary animals analyzed at 6 and 10 months after infection showed normal RV EF ( $n = 10$ ;  $68.9 \pm 1.8\%$ ,  $72.4 \pm 1.9\%$ , and  $67 \pm 2.5\%$  in *Luc*, wild-type *PKP2*, and R735X mutant respectively;  $p = \text{NS}$ ) (Figure 3B, after 10 months), which indicates a direct relationship between exercise and ventricular dysfunction. Interobserver intraclass correlation coefficient (absolute agreement) and mean bias of EF CMR measures were 0.91 (95% confidence interval: 0.78 to 0.96) and  $0.9 \mu\text{l}$  (95% confidence interval:  $-0.6$  to  $2.4$ ), respectively.

Evaluation of regional RV wall motion revealed areas of poor contractility, a specific characteristic of ARVC (4), in animals carrying the R735X mutation only when subjected to endurance training. The RV was divided into 11 segments (18). Wall motion was classified as abnormal in the presence of akinesia, hypokinesia, dyskinesia (in ventricular systole), or bulging (in ventricular diastole). Dichotomic diagnosis of ARVC by pre-specified dyskinetic analysis of these events identified the disease in 8 of 10 mice expressing the R735X mutant form of *PKP2*, compared with just 2 of 13 control mice (1 of 7 and 1 of 6 expressing wild-type *PKP2* or *Luc*, respectively;  $p = 0.008$ ) (Figure 3D). In sedentary mice, dyskinetic events occurred less frequently and did not correlate with any genotype after 10 months (1 of 10, 2 of 10, and 2 of 10 expressing the R735X mutant, wild-type *PKP2*, or *Luc*, respectively;  $p = 0.78$ ) (Figure 3C). The CMR analysis thus confirmed that AAV-mediated cardiac *trans*-expression of a disease-associated *PKP2* mutation in mice generates a phenotype characteristic of ARVC only after endurance training. Surface electrocardiographic analysis in trained mice revealed a trend toward QRS prolongation in animals expressing R735X mutant compared with control mice expressing wild-type *PKP2* or *Luc* (Online Figure 3B).

The advanced stages of ARVC are usually associated with fibrofatty replacement of RV ventricular mass (19). Despite the clear ARVC anatomic phenotype of endurance-trained R735X-infected mice in the imaging analysis, post-mortem histological evaluation revealed no evidence of myocardial fibrosis or fibrofatty cardiomyocyte replacement. Similarly, sedentary AAV-R735X-infected animals showed no evidence of fibrosis on post-mortem histological analysis at 6 months after infection. An absence of RV fibrofatty replacement was also reported in humans and plakoglobin-haploinsufficient mice, in which structural abnormalities in the RV were not linked to lipidic or fibrotic tissue infiltration (17). This particular *PKP2* dominant-negative model thus provides a complementary example of a mutant that segregates late cellular replacement events historically linked to the disease from the CMR-defined RV dysfunction used for clinical diagnosis.

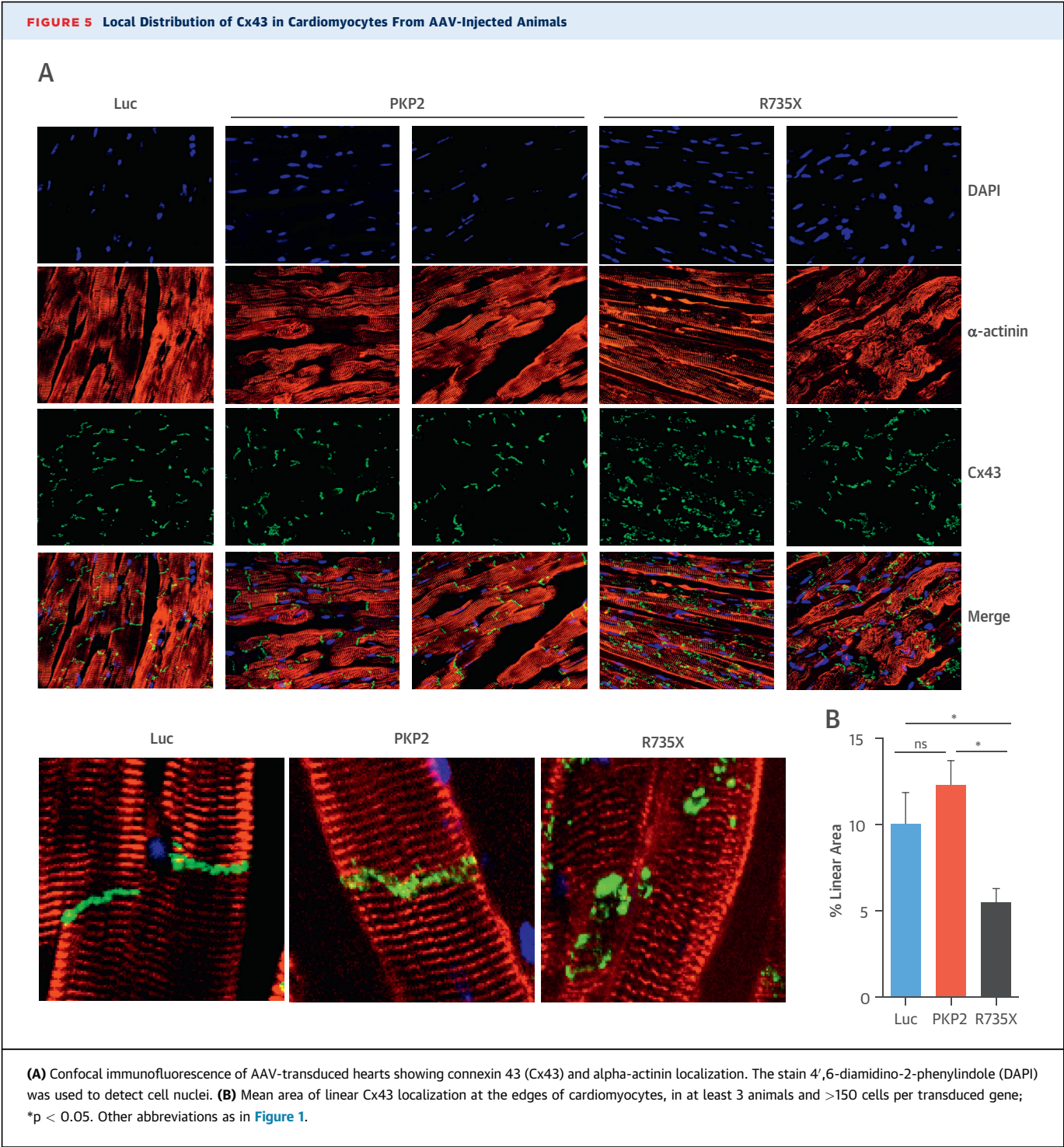
ARVC is often considered a desmosomal protein disease (20) because of its association with mutations in the genes encoding the 5 desmosomal protein components (Online Figure 4); however, patient biopsy samples and transgenic mouse models of ARVC do not always show evidence of ultrastructural abnormalities in cell-to-cell junctions (17,21). Transmission electron microscopy of heart tissue from exercised R735X-infected mice revealed normal desmosome organization and uniform intercellular spacing (Figures 4A and 4B). Plakoglobin signal level in heart biopsy samples has been suggested as a potential marker of ARVC (22). Immunocytochemical analysis of desmosome revealed proper plakoglobin localization between the cardiomyocytes in all mice injected (Figure 4C), similar to what could be observed when samples were stained for *PKP2* (Figure 4D). However, R735X-infected hearts did show alterations in the localization and distribution of the principal gap-junction component connexin 43 (Cx43) (23) at the short ends of cardiomyocytes (Figure 5A), despite normal expression levels of Cx43 mRNA and protein (Online Figures 5A and 5B). Cx43 gap junctions are required for proper electrical coupling between neighboring cardiomyocytes (24), and comparison of the Cx43 signal-forming links between cardiomyocytes showed significant mislocalization of staining in R735X mutant hearts compared with control subjects expressing *PKP2* or *Luc* only after 8 weeks of swimming exercise (Figure 5B). Exercised mutant mice showed abnormal organization at the intercalated disk, with the continuous organization pattern of Cx43 replaced by a punctate distribution. Immunofluorescence analysis of Cx43 organization in 6-month-old sedentary

**FIGURE 4** Desmosomal Analysis of Transduced AAV Mice



**(A)** Representative transmission electron microscopy images show intercardiomyocyte desmosome organization in PKP2a- and R735X-transduced heart (DP = dense plaque; ES = extracellular space; PM = plasma membrane). Heat map color code conversions of these images are shown on the right to aid visualization. **(B)** Distance between desmosomal dense plaques in intercardiomyocyte contacts after 8 weeks of endurance training. **(C)** Confocal immunofluorescence of AAV-transduced hearts showing plakoglobin and **(D)** plakophilin-2 localization at the intercalated discs. Cardiomyocyte autofluorescence was used to detect cell limits. Abbreviations as in [Figure 1](#).





R735X-infected mice revealed normal localization of Cx43 between cardiomyocytes, which indicates that exercise triggers ARVC in these mice.

### DISCUSSION

ARVC is a genetic disease associated with a high risk of heart dysfunction and sudden death. Because the

development and progression of heart manifestations in ARVC mutation carriers are difficult to predict, novel research approaches are needed to better study the gene-environment interaction associated with different causal mutations. In this study, we used a novel approach to study the impact of exercise on phenotypic ARVC expression in wild-type mice in which a human *PKP2* mutation was introduced



selectively in the heart by use of AAV vectors. The main results were as follows: 1) A single injection of AAV9 carrying the R735X mutation into wild-type mice results in stable, homogeneous, and long-term expression of the transgene in cardiomyocytes; 2) R735X mutant protein operates as a dominant-negative protein to induce ARVC independent of the expression of the wild-type Pkp2; and 3) although the AAV-mediated R735X mutation expression does not produce an overt ARVC phenotype in sedentary mice, exercise training triggers an ARVC phenotype evidenced by RV regional and global dysfunction, as well as mislocalization of cardiomyocyte Cx43 at the histological level (**Central Illustration**).

Our alternative approach, used here for the first time to study a cardiomyopathy, can boost the evaluation of different mutations and their interaction with the environment and even with other mutations. Our AAV-R735X model could serve to test genetic interactions in combination with new transgenic or knockout models without the need for tedious, costly, and time-consuming backcrosses.

We reasoned that because ventricular dysfunction in ARVC appears after birth and not during development in genetically predisposed patients, expression of disease-causing mutations in adult mouse hearts would trigger development of an ARVC-like phenotype. Our results confirmed this, showing that AAV-based transfer of the R735X dominant-negative form of human *PKP2a* interferes with the wild-type version encoded by the mouse genome and recapitulates the exercise-dependent RV dysfunction of ARVC.

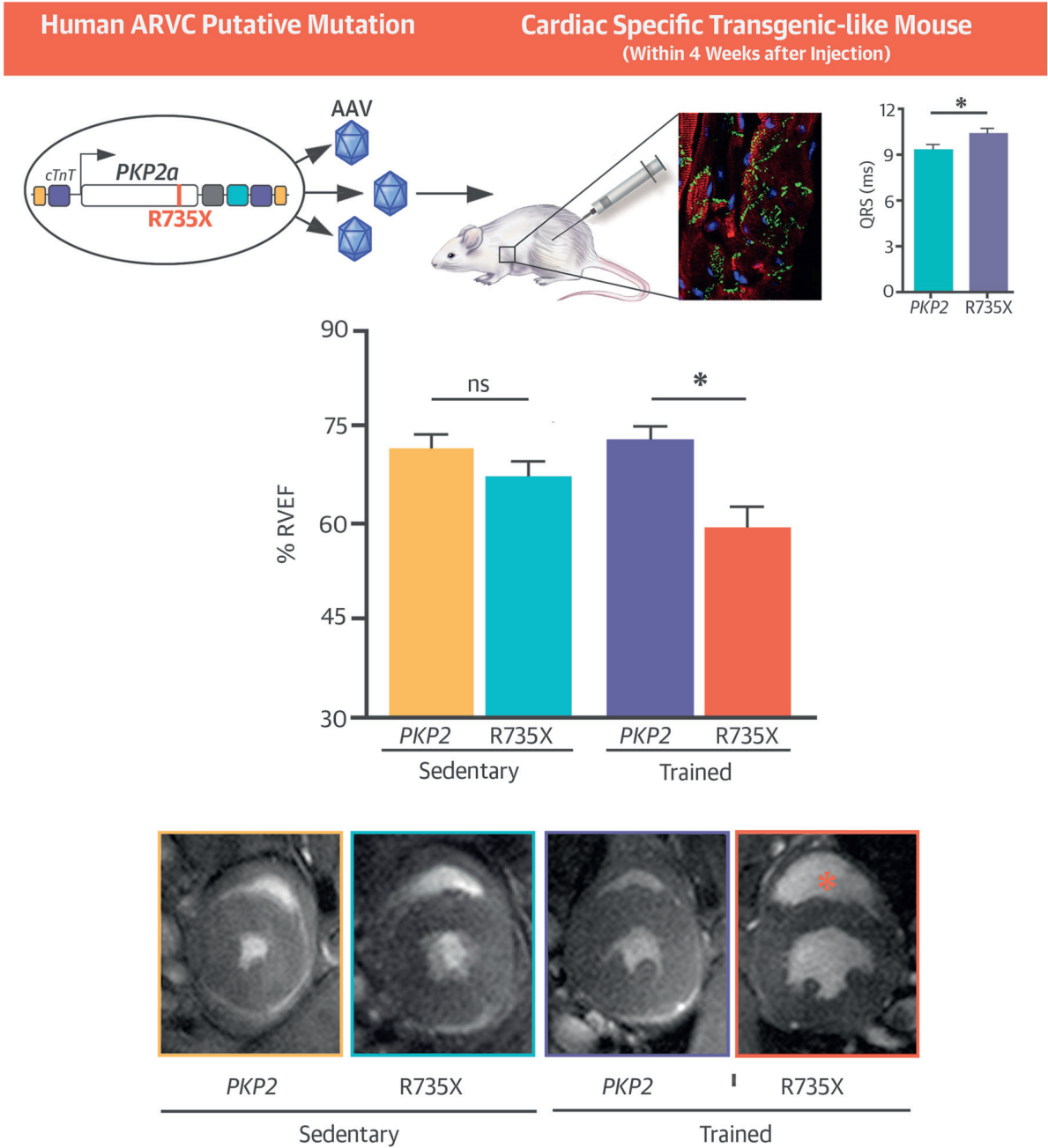
Patients with ARVC frequently show a predominant RV dysfunction without left ventricular (LV) involvement, although the reason behind this remains elusive. However, the ARVC phenotype can vary depending on the desmosomal component affected by the primary mutation. For example, disruption of intermediate filament binding (desmoplakin mutants) can result in dominant or severe LV involvement (8). In contrast, the phenotype associated with PKP2 mutations is that of classic ARVC, which accounts for most cases (25,26). Factors that might make the RV particularly vulnerable to impaired cell adhesion include thin walls, high distensibility, and variations in preload. Indeed, reports have documented reductions in RV function with exercise intensity (15). A link between long-term intensive exercise training, ventricular dysfunction, and predisposition to arrhythmogenic events has also been demonstrated (25,27). Moreover, RV dysfunction can become permanent in some athletes with a long history of competitive sports (28). RV afterload and pulmonary vascular resistance, which is low at

rest, may possibly induce an increase in pulmonary artery pressure during training (17). Unlike the transitional or, more rarely, permanent RV dysfunction in endurance athletes, the RV dysfunction associated with ARVC is progressive. In ARVC patients, training would have a greater impact on the RV than the LV if desmosomal mutations give a mechanical disadvantage to cardiomyocytes. Such a predominant effect on the RV has been shown in endurance-trained mice with heterozygous plakoglobin deficiency, in which exercise accelerated the development of RV dysfunction and arrhythmias (29–31). Similar to our mouse model, heterozygous plakoglobin deficiency in mice did not lead to an increase in fibrosis compared with control subjects. These data indicate that the mechanism by which these animals develop local dyskinesia is different from that induced by collagen deposition.

Endurance training increases the risk of developing RV dysfunction in mice expressing R735X by ~5-fold. The available data support the model of the intercalated disc as a functional unit in which macromolecular complexes interact to maintain synchrony in a cell population. These kinds of interactions have been demonstrated between desmosomes and gap junctions, and evidence that supports a functional link between Cx43 and PKP2 provides a possible explanation for the ARVC phenotype (32). In addition to desmosomes, PKP2 is also detected in other junctional structures (33), and the N-terminal head domain of PKP2 interacts directly with Cx43 (22). Our data confirm this interaction and show that cardiac *trans*-expression of mutant R735X in cardiac tissues can alter the distribution pattern of the associated gap junction protein Cx43. Some ARVC patients with mutations in *PKP2* also show abnormal protein levels or localization of Cx43 at the intercalated disk between cardiomyocytes (34), which is consistent with high conservation of desmosome structure throughout vertebrate evolution.

During exercise, right cardiac chambers undergo continuous preload variations and stretch. These forces can upregulate junction protein expression, as shown for mechanical junction proteins (plakoglobin, desmoplakin, and N-cadherin) and the gap junction protein Cx43 in neonatal rat ventricular myocytes subjected to pulsatile stretch (35). Exercise-related stretch has a stronger effect on the thinner RV free wall than on the LV and becomes pathological in patients with a genetic predisposition to lose cardiac tissue structural integrity. Our study shows that exercised R735X-infected mice, although expressing normal levels of Cx43 mRNA, develop an abnormally altered localization and distribution of the encoded gap-junction protein. This finding supports the view

**CENTRAL ILLUSTRATION** Exercise Triggers ARVC Phenotype in Mice



Cruz, F.M. et al. J Am Coll Cardiol. 2015; 65(14):1438-50.

The human arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) mutation of interest is packed within the adeno-associated virus (AAV) vector. The selection of the AAV serotype (AAV9) and the use of the cardiomyocyte-specific troponin T (cTnT) promoter enhance the cardiac-specific infection and expression of the mutant protein. A single injection in wild-type animals (through a peripheral vein) of the AAVs carrying the mutation is enough to generate a transgenic-like mouse. These mice show a stable long-term expression of the mutant protein of interest. The first manifestation of the ARVC phenotype is the widening of the QRS complex. Serial high-field cardiac magnetic resonance (CMR) examinations are performed to evaluate the appearance of ARVC anatomic features. Sedentary mice carrying the ARVC mutation do not show an overt ARVC anatomic phenotype despite showing electrocardiographic abnormalities. Conversely, challenging mice with endurance exercise training results in a clear ARVC anatomic phenotype (areas of right ventricular dyskinesia and global right ventricular ejection fraction [RVEF] reduction). Animals infected with control AAVs undergoing the same exercise protocol do not show any ARVC anatomic features, which suggests that exercise exacerbates the anatomic phenotype of the disease.

\*Area of dyskinesia.

of the intercalated disc as a functional unit and represents an abnormal response to exercise that triggers multiple pathological changes in the intercellular junction. Junctional changes also impact ion channel activity, with loss of PKP2 expression decreasing the sodium current, which further decreases conduction velocity and makes ventricular myocytes prone to re-entrant arrhythmias (36). Therefore, patients in the early stages of ARVC are at risk of lethal cardiac arrhythmia in the absence of structural and histological changes (37).

To better study the phenotype associated with mutant PKP2 expression and its interaction with exercise, surface electrocardiographic recordings were evaluated in trained mice and in long-term sedentary mice. QRS was prolonged in mice expressing the mutant form of PKP2 compared with control subjects, regardless of training status. QRS prolongation is frequently observed in patients with ARVC (38,39), and electrocardiographic abnormalities are an early event in ARVC patients that can precede any anatomic or functional abnormality (40). In that sense, it has been demonstrated that PKP2 and the voltage-gated sodium channel (Na<sub>v</sub>1.5) coexist in the same molecular complex, and dysfunction of the former alters the properties of the sodium current, which leads to slow conduction velocity (35). Future studies should confirm the association between mutant PKP2 expression and sodium channel properties, something beyond the scope of this work.

Defects in protein trafficking of intercalated discs are crucial for cardiomyocyte injury and development of electrical abnormalities in arrhythmogenic cardiomyopathies (41). We have demonstrated that PKP2 expression of a dominant-negative mutant R735X induces alterations in the localization and distribution of Cx43 at the intercalated discs, a potential origin for disease development. In a *Pkp2* model of haploinsufficiency, cardiomyocytes do not show alteration of proteins at the intercalating disc, although they present a sodium channel dysfunction. These data suggest that the ARVC disease mechanism is different depending on particular mutations in the same gene, which could operate as a dominant-negative protein or haploinsufficiency. Thus, these mechanisms may add variability to the system and to ARVC penetrance.

**CLINICAL IMPLICATIONS.** The lack of animal models that permit evaluation of different mutations remains a major limitation on research into ARVC. Over the past few years, more than 160 mutations have been described for the *PKP2* gene. It is always important to distinguish disease-causing mutations from normal genetic variability. This is

especially important in ARVC, in which gene-carrier patients are advised to radically reduce exercise and withdraw from competitive athletics. The consequences of an erroneous classification are greater for professional athletes, who stand to lose out on their chosen career. Although our data suggest that carriers of the R735X-encoding *PKP2a* mutant (c.2203C>T) should be banned from competitive sport to prevent ARVC development, they also indicate that the exercise-testing platform could be used to distinguish latent disease-causing mutations from nonpathological single-nucleotide polymorphisms.

**STUDY LIMITATIONS.** In the present study, we only observed early ARVC features (electrocardiogram and wall motion abnormalities), and no fibrofatty ventricular replacement was documented. Longer follow-up of these animals might have revealed additional ARVC features.

## CONCLUSIONS

The method described here, with which we showed that the R735X PKP2 mutant functions as a dominant-negative protein in ARVC, provides a versatile platform for investigating this disease. More importantly, we also showed that heterologous expression of wild-type human *PKP2* does not induce disease or altered function, which demonstrates that this approach can be used to evaluate potential disease-causing mutations. Additionally, our methodology represents an unprecedented opportunity to generate complex cardiac disease models and become a powerful tool in preclinical phenotyping and follow-up of complex autosomal-dominant cardiac hereditary disorders.

**ACKNOWLEDGEMENTS** The authors thank the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Viral Vector Unit for help with adeno-associated virus packaging, A.V. Alonso and M. Benito for heart image acquisition, C. Villa for suggestions on immunofluorescence staining, A. de Molina and R.B. Doohan for tissue sample preparation, K. Sato and A. Sedhukina for help in image analysis, A. Benitez-Sousa for mouse work, A.M. Santos for help with microscopy and ImageJ analysis, D. Filgueiras for critical reading of the manuscript, and S. Bartlett for text editing.

**REPRINT REQUESTS AND CORRESPONDENCE:** Dr. Juan A. Bernal or Dr. Borja Ibanez, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), c/Melchor Fernandez Almagro, 3, Madrid 28029, Spain. E-mail: [jabernal@cnic.es](mailto:jabernal@cnic.es) OR [bibanez@cnic.es](mailto:bibanez@cnic.es).

## PERSPECTIVES

**COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE:** Exercise is suspected to trigger clinical events in patients with the genetic mutations associated with ARVC, and animals with the most frequent form of the human R735X *PKP2* mutation subjected to endurance training develop an overt ARVC phenotype.

**COMPETENCY IN PATIENT CARE:** Experimental data in animals support the recommendation that patients with ARVC who have the R735X *PKP2* mutation curtail

the types of exercise associated with endurance training.

**TRANSLATIONAL OUTLOOK:** Further work using novel methods to study gene-to-gene and gene-environment interactions in transgenic animals could lead to the development of therapeutic strategies that inhibit the adverse effect of sustained exercise on the risk of lethal arrhythmia events and improve health outcomes in patients with ARVC.

## REFERENCES


- Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet* 2009;373:1289–300.
- Link MS, Laidlaw D, Polonsky B, et al. Ventricular arrhythmias in the North American multidisciplinary study of ARVC: predictors, characteristics, and treatment. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:119–25.
- Maron BJ, Chaitman BR, Ackerman MJ, et al. Recommendations for physical activity and recreational sports participation for young patients with genetic cardiovascular diseases. *Circulation* 2004;109:2807–16.
- Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* 2010;31:806–14.
- Rizzo S, Pilichou K, Thiene G, Basso C. The changing spectrum of arrhythmogenic (right ventricular) cardiomyopathy. *Cell Tissue Res* 2012;348:319–23.
- Marcus FI, Edson S, Towbin JA. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a practical guide for physicians. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1945–8.
- Groeneweg JA, van der Zwaag PA, Olde Nordkamp LR, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to revised 2010 Task Force criteria with inclusion of non-desmosomal phospholamban mutation carriers. *Am J Cardiol* 2013;112:1197–206.
- van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113:1650–8.
- Cox MG, van der Zwaag PA, van der Werf C, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: pathogenic desmosome mutations in index-patients predict outcome of family screening: Dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy genotype-phenotype follow-up study. *Circulation* 2011;123:2690–700.
- Pilichou K, Bezzina CR, Thiene G, Basso C. Arrhythmogenic cardiomyopathy: transgenic animal models provide novel insights into disease pathobiology. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4:318–26.
- Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113:356–64.
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy [published correction appears in *Nat Genet* 2005;37:106]. *Nat Genet* 2004;36:1162–4.
- Tan BY, Jain R, den Haan AD, et al. Shared desmosome gene findings in early and late onset arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;3:663–73.
- Prasad KM, Xu Y, Yang Z, Acton ST, French BA. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther* 2011;18:43–52.
- James CA, Bhonsale A, Tichnell C, et al. Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1290–7.
- Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988;318:129–33.
- Kirchhof P, Fabritz L, Zwiener M, et al. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 2006;114:1799–806.
- Sievers B, Addo M, Franken U, Trappe HJ. Right ventricular wall motion abnormalities found in healthy subjects by cardiovascular magnetic resonance imaging and characterized with a new segmental model. *J Cardiovasc Magn Reson* 2004;6:601–8.
- Basso C, Thiene G. Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: just a matter of fat? *Cardiovasc Pathol* 2005;14:37–41.
- Delmar M, McKenna WJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res* 2010;107:700–14.
- Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, et al. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J* 2006;27:1847–54.
- Asimaki A, Tandri H, Huang H, et al. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2009;360:1075–84.
- Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:1831–43.
- Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:76–82.
- La Gerche A, Burns AT, Mooney DJ, et al. Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes. *Eur Heart J* 2012;33:998–1006.
- Davila-Roman VG, Guest TM, Tuteur PG, Rowe WJ, Ladenson JH, Jaffe AS. Transient right but not left ventricular dysfunction after strenuous exercise at high altitude. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:468–73.
- Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, et al. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation* 2011;123:13–22.
- La Gerche A, Heidbuchel H, Burns AT, et al. Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. *Med Sci Sports Exerc* 2011;43:974–81.
- Delmar M, Makita N. Cardiac connexins, mutations and arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* 2012;27:236–41.

30. Noorman M, Hakim S, Kessler E, et al. Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 2013;10:412–9.
31. Paul M, Wichter T, Gerss J, et al. Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2013;111:1488–95.
32. Sato PY, Coombs W, Lin X, et al. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res* 2011;109:193–201.
33. Agullo-Pascual E, Reid DA, Keegan S, et al. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc Res* 2013;100:231–40.
34. Yamada K, Green KG, Samarel AM, Saffitz JE. Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. *Circ Res* 2005;97:346–53.
35. Sato PY, Musa H, Coombs W, et al. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2009;105:523–6.
36. Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, et al. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm* 2004;1:3–11.
37. Cox MG, Nelen MR, Wilde AA, et al. Activation delay and VT parameters in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: toward improvement of diagnostic ECG criteria. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:775–81.
38. te Riele AS, Bhonsale A, James CA, et al. Incremental value of cardiac magnetic resonance imaging in arrhythmic risk stratification of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1761–9.
39. te Riele AS, James CA, Rastegar N, et al. Yield of serial evaluation in at-risk family members of patients with ARVD/C. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:293–301.
40. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, et al. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2014;6:240ra74.
41. Cerrone M, Noorman M, Lin X, et al. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res* 2012;95:460–8.

---

**KEY WORDS** arrhythmia, ARVC, dysplasia, mutation, transgenic mice

---

 **APPENDIX** For expanded Methods and Results sections, including supplemental videos and their legends, please see the online version of this article.



*OTRAS PUBLICACIONES*





# Induction of Sustained Hypercholesterolemia by Single Adeno-Associated Virus–Mediated Gene Transfer of Mutant hPCSK9

Marta Roche-Molina, David Sanz-Rosa, Francisco M. Cruz, Jaime García-Prieto, Sergio López, Rocío Abia, Francisco J.G. Muriana, Valentín Fuster, Borja Ibáñez, Juan A. Bernal

**Objectives**—Patients with mutations in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) gene have hypercholesterolemia and are at high risk of adverse cardiovascular events. We aimed to stably express the pathological human D374Y gain-of-function mutant form of *PCSK9* (*PCSK9<sup>DY</sup>*) in adult wild-type mice to generate a hyperlipidemic and proatherogenic animal model, achieved with a single systemic injection with adeno-associated virus (AAV).

**Approach and Results**—We constructed an AAV-based vector to support targeted transfer of the *PCSK9<sup>DY</sup>* gene to liver. After injection with  $3.5 \times 10^{10}$  viral particles, mice in the C57BL/6J, 129/SvPasCrlf, or FVB/NCrl backgrounds developed long-term hyperlipidemia with a strong increase in serum low-density lipoprotein. Macroscopic and histological analysis showed atherosclerotic lesions in the aortas of AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* mice fed a high-fat-diet. Advanced lesions in these high-fat-diet-fed mice also showed evidence of macrophage infiltration and fibrous cap formation. Hepatic AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* infection did not result in liver damage or signs of immunologic response. We further tested the use of AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* to study potential genetic interaction with the *ApoE* gene. Histological analysis of *ApoE*<sup>−/−</sup> AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* mice showed a synergistic response to *ApoE* deficiency, with aortic lesions twice as extensive in *ApoE*<sup>−/−</sup> AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>*-transexpressing mice as in *ApoE*<sup>−/−</sup> AAV-*Luc* controls without altering serum cholesterol levels.

**Conclusions**—Single intravenous AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* injection is a fast, easy, and cost-effective approach, resulting in rapid and long-term sustained hyperlipidemia and atherosclerosis. We demonstrate as a proof of concept the synergy between *PCSK9<sup>DY</sup>* gain-of-function and *ApoE* deficiency. This methodology could allow testing of the genetic interaction of several mutations without the need for complex and time-consuming backcrosses. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:50–59. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303617.)

**Key Words:** atherosclerosis ■ hypercholesterolemia ■ PCSK9

Cardiovascular complications derived from progressive degeneration of the vascular system are expected to remain leading causes of morbidity and mortality worldwide.<sup>1</sup> Hypercholesterolemia and associated atherosclerosis develop through interaction of complex genetic networks with environmental cues. Animal models of atherosclerosis have greatly increased our understanding of the disease and have been instrumental in the development of treatment approaches, with the *apolipoprotein-E*-deficient (*ApoE*<sup>−/−</sup>) mouse being the most widely used mouse model of atherosclerosis to date.<sup>2</sup> The ApoE protein is synthesized in liver and macrophages and plays an important role in lipid homeostasis.<sup>3,4</sup> As a component of plasma lipoproteins, it serves as a ligand for cell–surface receptors, such as

### See accompanying editorial on page 11

low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) and related proteins. This interaction promotes the cellular uptake of atherogenic particles from the circulation.<sup>5</sup> Homozygous gene deletion of *ApoE* or *Ldlr* causes severe hypercholesterolemia and spontaneous atherosclerosis.<sup>6,7</sup> Another key regulator of lipid homeostasis is proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Recent animal studies show that PCSK9 reduces hepatic uptake of LDL by increasing the endosomal and lysosomal degradation of LDLR,<sup>8</sup> suggesting a possible treatment target for the nonresponsiveness of a subset of patients treated with cholesterol-lowering statins,

Received on: March 9, 2014; final version accepted on: October 8, 2014.

From the Cardiovascular Development and Repair Department (M.R.-M., F.M.C., J.A.B.), and Epidemiology, Atherothrombosis and Imaging Department (D.S.-R., J.G.-P., V.F., B.I.), Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain; Laboratory of Cellular and Molecular Nutrition, Instituto de la Grasa (CSIC), Seville, Spain (S.L., R.A., F.J.G.M.); The Zena and Michael A Wiener Cardiovascular Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY (V.F.); and Cardiovascular Institute, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain (B.I.).

**The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.114.303617/-/DC1>.**

Correspondence to Juan A. Bernal, PhD, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, Spain. E-mail [jabernal@cnic.es](mailto:jabernal@cnic.es)  
© 2014 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303617

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>AAV</b>	adeno-associated virus
<b>ApoE</b>	apolipoprotein E
<b>CM</b>	chylomicron
<b>IDL</b>	intermediate density lipoprotein
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>LDLR</b>	LDL receptor
<b>PCSK9</b>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<b>PCSK9<sup>DY</sup></b>	D374Y PCSK9 mutant
<b>tChol</b>	total cholesterol
<b>TG</b>	triglyceride
<b>VLDL</b>	very low-density lipoprotein

who maintain excessive levels of cholesterol, particularly LDL.<sup>9–11</sup> Mice deficient for PCSK9 protein have low plasma LDL cholesterol levels and are protected against atherosclerosis development<sup>12</sup>; in contrast, gain-of-function *PCSK9* mutants<sup>13</sup> have hypercholesterolemia and accelerated atherosclerosis generation.<sup>14–16</sup> The most severe mutation described in *PCSK9*, identified in 2 populations,<sup>10,17</sup> results in cholesterol levels above 500 mg/dL. The mutation, an amino-acid substitution of Asp374 by Tyr (D374Y), increases the affinity of PCSK9 for the LDLR by  $\geq 10$ -fold.<sup>18</sup> Further animal research is needed to increase understanding of the biology of PCSK9 in different scenarios, genetic backgrounds, and in association with lipid-altering genetic modifications. More versatile models would help to characterize the effect of different therapies targeting PCSK9.

Adeno-associated virus (AAV) vectors efficiently transduce dividing and nondividing cells, escape immune surveillance, and achieve long-term gene transfer.<sup>19,20</sup> These features make AAV vectors a successful gene therapy approach for reverting genetic dysfunctions in preclinical models,<sup>21,22</sup> and to date, these vectors

have been tested as a tool for reverting genetic disease. However, the same rationale could be used to cause a disease, generating a model for experimental analysis, but to our knowledge, this alternative application has not been tested to date. Here, we present a method for generating a mouse model of disease by AAV injection and subsequent stable expression of a disease-causing mutation in wild-type mice, demonstrating that AAV-mediated *PCSK9* gene transfer induces hyperlipidemia and subsequent atherosclerosis. This method provides a convenient system for exploring potential genetic interactions of *PCSK9* and its contribution to atherosclerosis development.

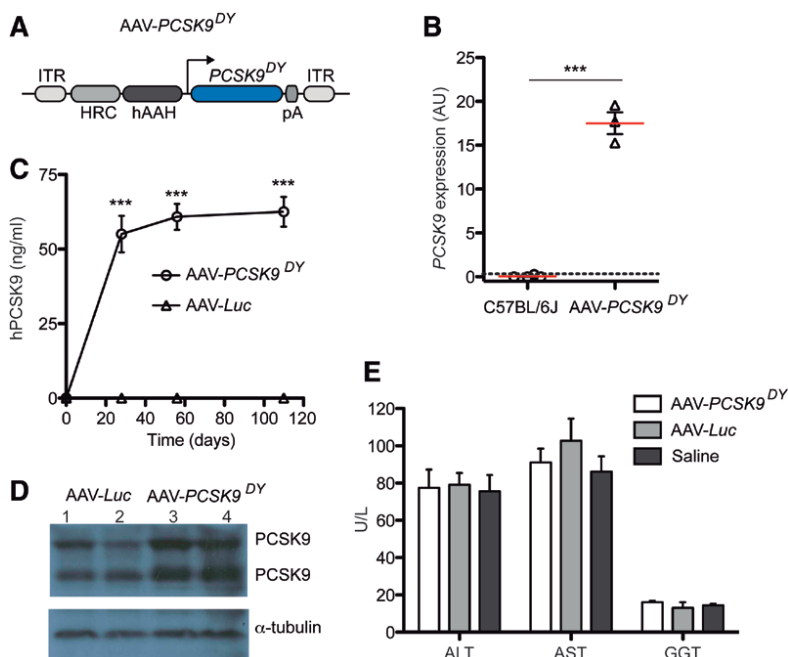
## Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement.

## Results

Generation and Long-Term Lipid Profile of AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* Expressing Mice

The liver is the main site of lipoprotein transit and metabolism. Hepatocytes control blood LDL levels through the expression of *PCSK9*, the major regulator of the LDLR.<sup>23,24</sup> Dysregulation of this pathway by gain-of-function mutations in *PCSK9*, such as D374Y<sup>25,26</sup> (*PCSK9<sup>DY</sup>*), is linked to hypercholesterolemia and atherosclerosis.<sup>27–29</sup> To test the effect of stable liver transexpression of this mutant on plasma lipoprotein homeostasis and atherosclerosis development in adult animals, we generated an AAV vector encoding human *PCSK9<sup>DY</sup>* (Figure 1A). *PCSK9<sup>DY</sup>* gene expression was directed to hepatocytes by driving the open reading frame from the liver-specific promoter HCR-hAAH.<sup>30</sup> The AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>* vector was used to encapsidate viral particles in serotype 9. A single intravenous femoral injection of 30-day-old wild-type C57BL/6J mice with  $3.5 \times 10^{10}$  viral particles resulted in stable *PCSK9<sup>DY</sup>* mRNA expression in



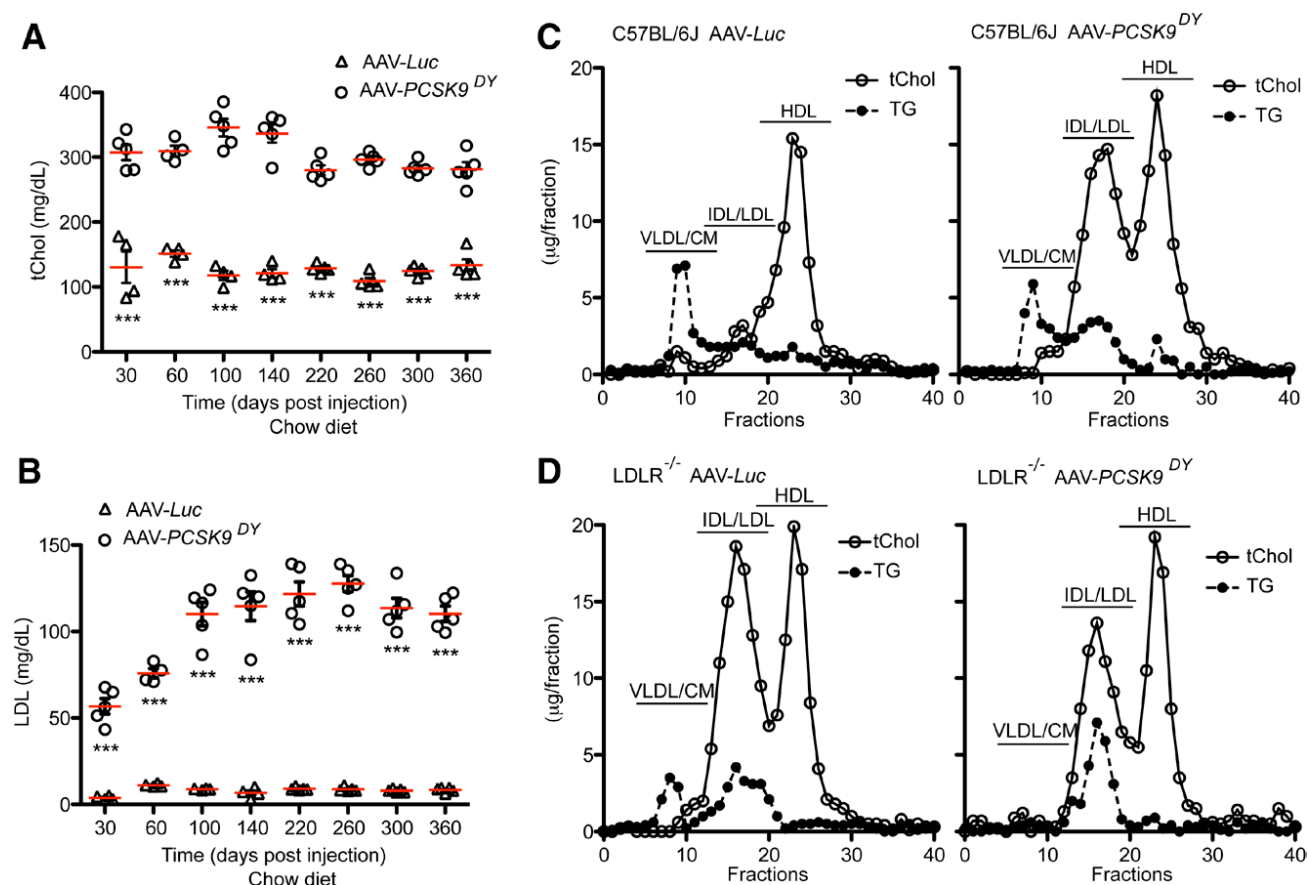
**Figure 1.** A, Structure of the adeno-associated virus (AAV) vector carrying the human D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant (*PCSK9<sup>DY</sup>*) gene driven by the liver-specific HRC-hAAH promoter. B, Real-time PCR analysis of *PCSK9<sup>DY</sup>* mRNA in mouse liver 110 days after injection. *PCSK9<sup>DY</sup>* mRNA amounts are normalized to *Gapdh* mRNA and are presented relative to the level in wild-type (WT) animals (n=3–4; \*\*\*P<0.001, unpaired Student *t* test). Each data point denotes an individual mouse, horizontal red bars denote mean values, and black bars denote SEM. C, Serum levels of human PCSK9 protein in mice injected with *PCSK9<sup>DY</sup>* virus. C57BL/6J, AAV *Luc*-injected control mice (n=5–8; \*\*\*P<0.001, unpaired Student *t* test). D, Liver PCSK9 protein levels analyzed by western blot and normalized to  $\alpha$ -tubulin. Mice 1 and 2 were injected with AAV *Luc* control, mice 3 and 4 with AAV-*PCSK9<sup>DY</sup>*. E, Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) were measured at the same time point and determined as described in Materials and Methods. ITR indicates AAV inverted terminal repeat; and pA, polyadenylation sequence.

the liver, measured after 110 days (Figure 1B). PCSK9<sup>DY</sup> protein release to the bloodstream remained constant during the course of the experiment (Figure 1C). PCSK9<sup>DY</sup> protein also accumulated in liver samples (Figure 1D), demonstrating that this approach is a robust and reproducible method for overexpressing human PCSK9<sup>DY</sup>. AAV viral infection does not elicit any reported adverse responses in animals, and postinjection levels of serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and  $\gamma$ -glutamyl transferase were similar to those of uninfected mice and mice infected with AAV9 viral particles expressing *Luciferase* (AAV-*Luc*) from a nonspecific liver promoter (Figure 1E). AAV viral infection and ectopic specific-liver expression thus does not induce hepatotoxicity in PCSK9<sup>DY</sup>-expressing animals. Consistent with these results, we did not observe changes in white cell counts 2 weeks after infection (Table I in the online-only Data Supplement), indicating that the viral transduction and extracellular transgene expression did not elicit an immunologic response in these mice.

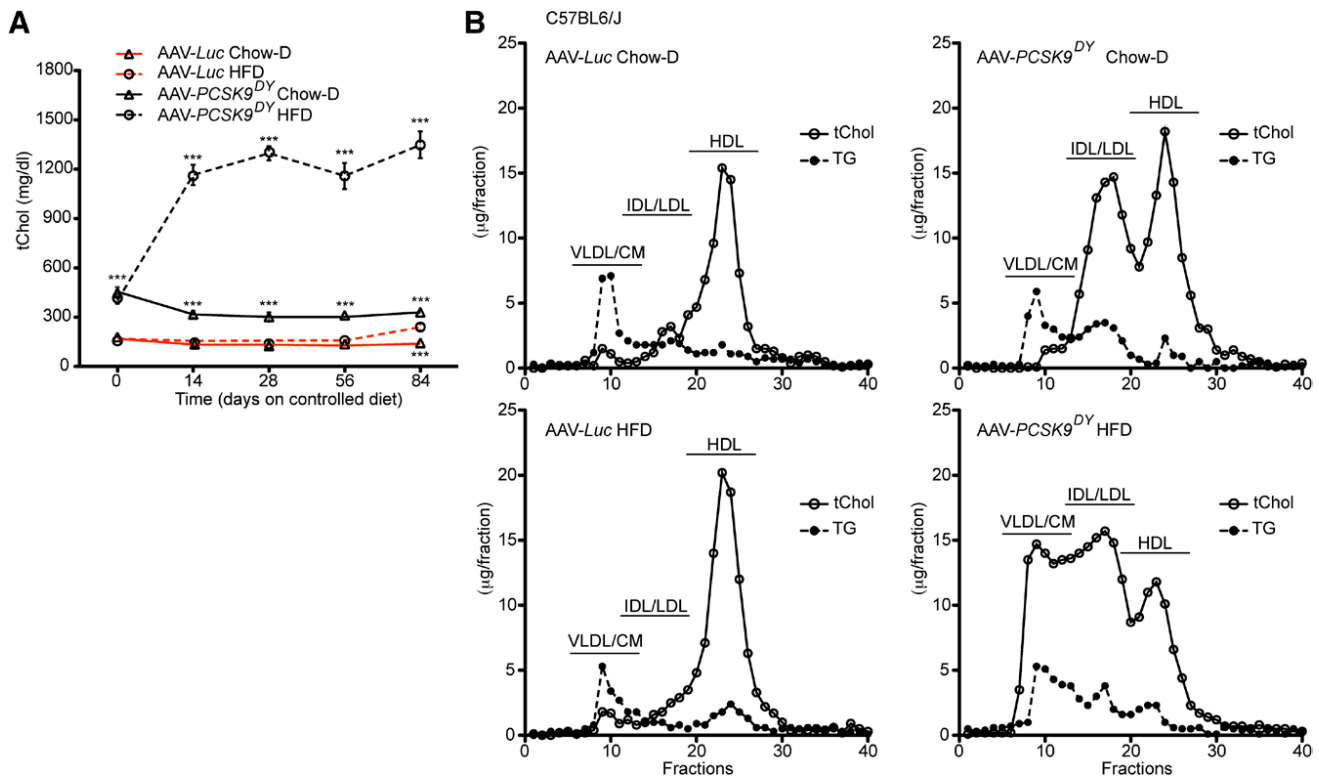
PCSK9<sup>DY</sup> transexpression in hepatocytes increased serum cholesterol levels in overnight-fasted mice maintained on a regular chow diet at all postinjection times analyzed

(Figure 2A and 2B). At 30 days post injection, total serum cholesterol (tChol) in AAV-PCSK9<sup>DY</sup> transexpressing mice was double that in AAV-*Luc*-injected controls (307 $\pm$ 12 versus 130 $\pm$ 24 mg/dL). These differences were more-over maintained 1 year after injection, demonstrating the chronic effect of a single AAV injection on systemic lipid levels. Among cholesterol fractions, LDL levels increased significantly between days 30 and 100 after PCSK9<sup>DY</sup> gene transfer (56 $\pm$ 4.5 versus 110 $\pm$ 6.7 mg/dL;  $P<0.001$ ) and then remained stable between days 140 and 260 (114.6 $\pm$ 8.1 and 127.6 $\pm$ 4.6 mg/dL; Figure 2B). After 1 year, serum LDL in AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-injected animals fed a regular chow diet was 10-fold higher than in AAV-*Luc*-injected controls. The AAV PCSK9 gain-of-function approach thus induces a dyslipidemia with a strong LDL component that is sustained over long periods.

To confirm the increase in LDL, we analyzed cholesterol and triglyceride distribution in serum samples by fast protein liquid chromatography. The increases in tChol and triglyceride in PCSK9<sup>DY</sup>-expressing C57BL/6J mice were because of specific accumulation of LDL and intermediate density lipoprotein (IDL), suggesting that



**Figure 2.** Serum levels of total cholesterol (tChol; **A**) and low-density lipoprotein (LDL; **B**) in control (AAV [adeno-associated virus] *Luc*-injected) C57BL/6J mice and AAV-PCSK9<sup>DY</sup> (D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant) mice. Blood was obtained after overnight fasting. \*\*\* $P<0.001$  and ns,  $P>0.05$  by 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test ( $n=4-5$ ). Each data point denotes an individual mouse, horizontal red bars denote mean values, and black bars denote SEM. **C** and **D**, Fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis of tChol and triglyceride (TG) in pooled serum samples from overnight-fasted C57BL/6J and LDLR<sup>-/-</sup> mice transduced with AAV-*Luc* or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> ( $n=4-6$ ). CM/VLDL indicates chylomicron and very low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; IDL/LDL, intermediate density lipoprotein.



**Figure 3. A,** Serum levels (mg/dL) of total cholesterol (tChol) in C57BL/6J mice transduced with AAV-Luc or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> (D374Y pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant) 60 days before starting the analysis (time 0). Mice were maintained for the indicated periods on chow or high-fat-diet (HFD). Blood was obtained after overnight fasting. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ ; ns,  $P > 0.05$  versus AAV-Luc or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> on chow diet (2-way ANOVA followed by Bonferroni post test; means  $\pm$  SEM,  $n = 5-7$ ). **B,** FPLC profile of tChol and triglyceride (TG) in pooled samples at the end of the experiment. AAV indicates adeno-associated virus; CM/VLDL, chylomicron and very low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; IDL/LDL, intermediate density lipoprotein.

PCSK9<sup>DY</sup>-mediated LDLR dysregulation induces a predominant IDL/LDL hyperlipidemia (Figure 2C). Consistent with this view, analysis of liver samples revealed below-normal LDLR protein levels in AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transduced mice (Figure I in the online-only Data Supplement). If this abnormal LDLR degradation is the cause of the PCSK9<sup>DY</sup>-induced hyperlipidemia, AAV-PCSK9<sup>DY</sup> injection should not induce major changes in an LDLR genetic knockout; as predicted, LDLR<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> showed no increase in total triglyceride, tChol, or IDL/LDL (Figure 2D; Figure II in the online-only Data Supplement), confirming that LDLR degradation contributes to PCSK9<sup>DY</sup>-mediated lipid dysregulation.

The *in vitro* binding affinity of mutant PCSK9<sup>DY</sup> to the LDLR is  $>10\times$  higher than that of wild-type PCSK9. We therefore evaluated whether AAV particles expressing wild-type PCSK9 were able to dysregulate LDL *in vivo* to a similar or lesser extent as PCSK9<sup>DY</sup>. We observed that AAV-PCSK9-infected C57BL/6J mice had significantly lower levels of IDL/LDL lipoproteins in serum samples than AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-injected mice (Figure III in the online-only Data Supplement). This difference could explain why individuals expressing PCSK9<sup>DY</sup> at similar levels to wild-type PCSK9 can develop severe dyslipidemia.

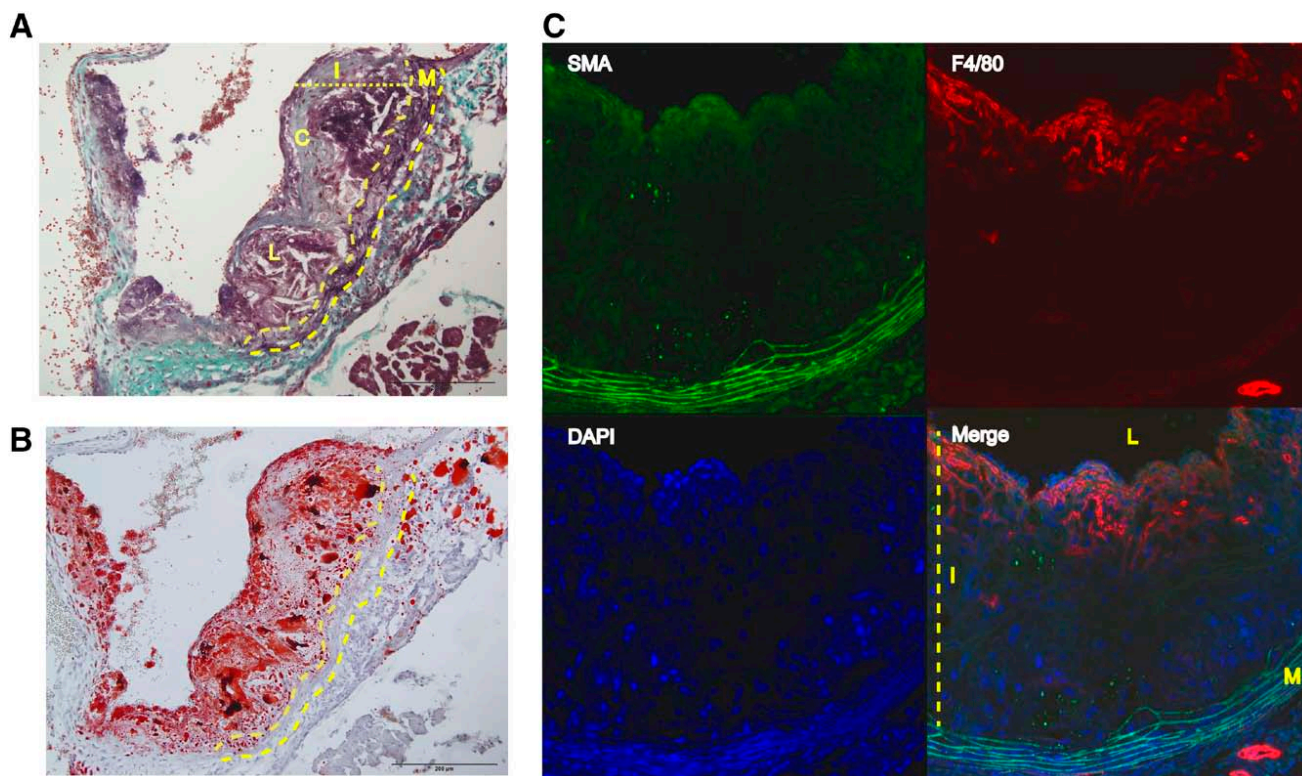
We also studied the effect of PCSK9<sup>DY</sup> expression on the endogenous mRNA and protein levels of PCSK9. Although we did not detect significant differences at the transcriptional level,

we observed a consistent accumulation of endogenous mouse PCSK9 in serum samples of mice infected with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> (Figure IV in the online-only Data Supplement). This result indicates that when the PCSK9<sup>DY</sup> is present, the rate of endogenous mouse PCSK9 protein turnover is slower than normal.

### High-Fat-Diet Exacerbates Hyperlipidemia in PCSK9<sup>DY</sup>-Expressing Animals

To evaluate the response to fat intake and atherogenesis susceptibility in PCSK9<sup>DY</sup>-expressing animals, we tested the effect of high-fat-diet (HFD) on cholesterol management. Mice were injected with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> or AAV-Luc 60 days before starting the dietary regime. At that time, mice were randomized to the HFD or standard chow for an additional 84 days. Fourteen days after HFD initiation, serum tChol in HFD-fed AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transducing mice was almost  $3\times$  higher than in similarly injected mice fed the chow diet ( $1165 \pm 61$  versus  $316 \pm 21$  mg/dL; Figure 3A). Fast protein liquid chromatography revealed that the hyperlipidemic response to HFD was stronger in the very-low-density lipoprotein (VLDL) and chylomicron (CM) fractions than in the IDL/LDL fraction (Figure 3B). In contrast, diet had little significant effect on the cholesterol profile in AAV-Luc-infected mice, demonstrating that the diet-induced hyperlipidemia in AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-infected mice is a consequence of PCSK9<sup>DY</sup> expression (Figure 3A and 3B). It is also





**Figure 4.** Atherosclerotic lesions in C57BL/6J mice transduced with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> (D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant) and fed a high-fat-diet (HFD). **A** and **B**, Representative staining of the aortic sinus with Masson's trichrome and elastin (connective tissue; **A**) and Oil-red O (**B**). The elastic lamina (yellow dashed lines) is stained black. Bars, 200  $\mu$ m. **C**, Representative immunostaining of macrophages (right) and smooth muscle cells (SMC; left) in aortic sinus lesions of AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transduced C57BL/6J mice fed an HFD for 84 days. Lesions were stained for biomarkers of macrophages (F4/80; red) and SMCs ( $\alpha$ -actinin; green); nuclei were stained with DAPI (blue). Merged images are also shown. AAV indicates adeno-associated virus; C, collagen in lesions; L, lipids; M, tunica media; and I, tunica intima.

notable that AAV-*Luc* and AAV-PCSK9<sup>DY</sup> mice maintained a baseline difference in serum tChol and LDL 60 days after virus injection, corresponding to day 0 of the dietary regime ( $168 \pm 2$  versus  $454 \pm 28$  mg/dL for tChol, 3A); this difference strengthens the results shown in Figure 2. We also confirmed that expression of the PCSK9<sup>DY</sup> transgene was not suppressed in response to 84 days of HFD (Figure V in the online-only Data Supplement), consistent with results obtained in the PCSK9<sup>DY</sup> transgenic pig model.<sup>28</sup> These data demonstrate that AAV-mediated PCSK9<sup>DY</sup> transexpression is a robust and easy methodology for generating animals that develop hyperlipidemia in response to HFD.

Hyperlipidemia can provoke the development of lesions throughout the vasculature, and this is greatly exacerbated by HFD.<sup>5–7,26</sup> *En face* staining of aortas with Oil Red O revealed lesions in the thoracic aortas, aortic arches, and secondary arterial branches of all HFD-fed AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transduced mice but not in the vessels of similarly fed AAV-*Luc* mice (Figure VI in the online-only Data Supplement). These results confirm that hyperlipidemia induced by AAV-PCSK9<sup>DY</sup> transduction is a useful tool for studies of atherosclerosis. Histological analysis at the aortic sinus also revealed that lesions in fat-fed AAV-PCSK9<sup>DY</sup> mice were complex, progressing well beyond the fatty streaks seen in chow-diet-fed mice expressing the PCSK9<sup>DY</sup> gene (Figure 4A and 4B). Immunofluorescence staining for markers of macrophages (F4/80) and smooth

muscle ( $\alpha$ -smooth-muscle-actin) confirmed macrophage infiltration of the plaque and the migration of smooth muscle cells from the intima to the aortic lumen to form a fibrous cap, features of a developed plaque (Figure 4C).

#### AAV-Mediated PCSK9<sup>DY</sup> Expression Induces Hyperlipidemia and Atherosclerosis in Different Genetic Backgrounds

To test the potential of AAV-PCSK9<sup>DY</sup> for generating hyperlipidemic animals with different genetic backgrounds, we compared the responses of C57BL/6J, 129/SvPasCrlf, and FVB/NCrI mice. A single intravenous injection of  $3.5 \times 10^{10}$  AAV-PCSK9<sup>DY</sup> virus altered cholesterol homeostasis in all 3 lineages as measured at 30 days post-AAV injection. Liver PCSK9<sup>DY</sup> transexpression led to significant increases in tChol (68%, 36%, and 40%, respectively) with concomitant increases in LDL (152%, 70%, and 138%). Changes in cholesterol fractions remained stable for 60 days (Table), when the mice were randomized for feeding with HFD or standard chow. All 3 mouse strains showed an HFD-dependent increase in serum lipoprotein levels (Table).

After killing, mice were analyzed for fast protein liquid chromatography lipid profile (Figure VII in the online-only Data Supplement), liver PCSK9<sup>DY</sup> content, and serum protein accumulation (Figure VIII in the online-only Data Supplement). Aortic atherosclerotic lesions were analyzed

by Masson's trichrome and Oil Red O-staining (Figure 5A and 5B). Quantification of the cross-sectional area of plaques at the level of the aortic sinus confirmed larger plaques in the atherosclerosis-susceptible C57BL/6J strain than in 129/SvPasCrlf mice ( $0.112 \pm 0.027$  versus  $0.007 \pm 0.003$  mm<sup>2</sup>) and FVB/NCrl mice, where lesions and foam cells were almost absent (Figure 5C and Ref. 31). Chow-fed AAV-PCSK9<sup>DY</sup> C57BL/6J mice did not show the notable basal lesion development seen in HFD-fed mice. Although the overall pattern of lipoprotein changes was seen across all 3 mouse strains, with a diet-induced increase in the IDL/LDL fraction, there were differences suggestive of differing susceptibility to atherosclerosis, consistent with the reported influence of genetic background on atherosclerosis in *ApoE*<sup>-/-</sup>.<sup>32,33</sup>

### Atherosclerotic Lesion Development in *ApoE*<sup>-/-</sup> and PCSK9<sup>DY</sup>-Expressing Mice

PCSK9 induces posttranslational downregulation of hepatic LDLR by diverting recycling LDLR into the endosomal-lysosomal pathway, leading to degradation.<sup>8,24</sup> The hypercholesterolemic phenotype of transgenic mice overexpressing wild-type<sup>34</sup> or mutant PCSK9<sup>26</sup> therefore resembles that of *LDLR*<sup>-/-</sup> mice. We therefore hypothesized that AAV-PCSK9<sup>DY</sup> transduction in an *ApoE*<sup>-/-</sup> background would partially recapitulate features of the *ApoE*<sup>-/-</sup> *LDLR*<sup>-/-</sup> double knockout<sup>5</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup> PCSK9 transgenic<sup>12</sup> mice. We first compared serum lipoprotein levels in fasted *ApoE*<sup>-/-</sup> mice transduced with AAV-*Luc* or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> and maintained on a chow diet (Figure 6A and 6B). Consistent with previous findings in *ApoE*<sup>-/-</sup> PCSK9 transgenic mice,<sup>12</sup> at 120 days postinjection, lipoprotein levels in AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transduced *ApoE*<sup>-/-</sup> mice did not differ significantly from the levels in the *ApoE*<sup>-/-</sup> AAV-*Luc* controls fed the same

diet (Figure 6A). In both AAV groups, lipoprotein levels increased markedly in response to HFD. Over the 84-day dietary regime, *ApoE*<sup>-/-</sup> AAV-PCSK9<sup>DY</sup> showed higher lipoprotein levels than *ApoE*<sup>-/-</sup> AAV-*Luc* mice, but the difference was statistically significant only at 14 days ( $743 \pm 32$  versus  $1074 \pm 89$  mg/dL for tChol). Fast protein liquid chromatography lipoprotein analysis showed that AAV-*Luc* and AAV-PCSK9<sup>DY</sup> mice on an *ApoE*<sup>-/-</sup> genetic background and maintained on a chow diet accumulated mainly VLDL/CM lipoproteins. This analysis also confirmed that mice transduced with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> accumulated more IDL/LDL lipoproteins and that the hyperlipidemic response to HFD was stronger in the VLDL/CM fractions than in the IDL/LDL fraction (Figure 6B).

We then compared plaque size in C57BL/6J and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-*Luc* or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> particles (Figure 7A). *ApoE*-deficient mice on a chow diet spontaneously develop atheroma plaques at a young age,<sup>6</sup> whereas appearance of lesions in LDLR-deficient or PCSK9-transgenic mice requires a longer period or HFD.<sup>12,35</sup> Quantification of plaque cross-sectional area in slices at the level of the aortic sinus (Figure 7B) confirmed that only *ApoE*<sup>-/-</sup> mice develop plaques on a chow diet, with plaques being significantly larger in AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transduced *ApoE*<sup>-/-</sup> mice than AAV-*Luc*. After 84 days on the HFD, lesions were observed in C57BL/6J and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice transduced with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> ( $0.35 \pm 0.03$  and  $0.71 \pm 0.15$  mm<sup>2</sup>) and in *ApoE*<sup>-/-</sup> transduced with AAV-*Luc* ( $0.36 \pm 0.02$  mm<sup>2</sup>). *En face* Oil Red O staining of aortas revealed lesions in the aortas and aortic branches (brachiocephalic, left common carotid, and left subclavian artery) of HFD-fed AAV-PCSK9<sup>DY</sup> mice and AAV-*Luc*-transduced *ApoE*<sup>-/-</sup> mice (Figure 7C). As predicted,<sup>12</sup> combined PCSK9<sup>DY</sup> expression and ApoE deficiency had a synergistic effect, with lesions in

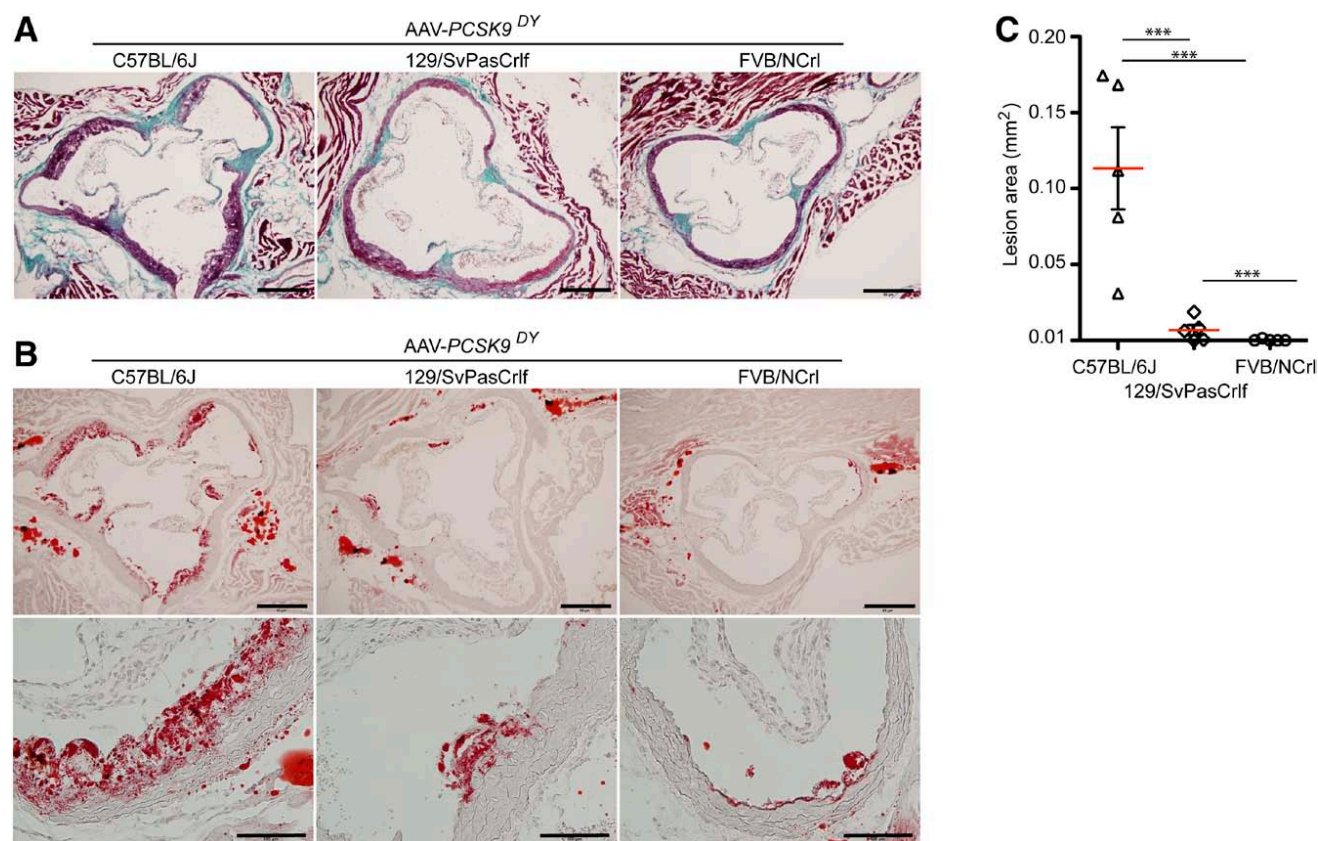
**Table. Overnight-Fasted Serum Levels of tChol and LDL (mg/dL) in C57BL/6J, 129/SvPasCrlf, and FVB/NCrl Mice Injected With AAV-*Luc* (control) or AAV-PCSK9<sup>DY</sup> Before the Analysis and Fed Standard Chow Diet or HFD for the Indicated Times**

Time	FVB/NCrl		129/SvPasCrlf		C57BL/6J	
	AAV- <i>Luc</i>	AAV-PCSK9 <sup>DY</sup>	AAV- <i>Luc</i>	AAV-PCSK9 <sup>DY</sup>	AAV- <i>Luc</i>	AAV-PCSK9 <sup>DY</sup>
<b>tChol</b>						
Chow diet						
4 weeks	204.12±6.38	337.1±7.12*	135.07±17.06	206.4±16.68	128±8.60	258.5±19.80
8 weeks	232.87±7.21	326.18±13.34*	203.66±11.45	281.72±16.02	163.38±32.90	274.02±7.87
HFD diet						
12 weeks	260.1±37.73	381.2±32.44*	226.08±19.86	317.62±25.22	225.76±2.59	321.58±17.02
24 weeks	359.9±23.40	524.28±47.30*	156.08±16.15	370.28±43.94	175.98±8.70	388.22±69.53
<b>LDL</b>						
Chow diet						
4 weeks	19.26±1.66	53.07±8.20*	9.41±1.17	20.02±5.00	10.88±1.76	51.38±3.62
8 weeks	24.41±6.65	50.49±4.70*	24.89±1.00	42.5±7.03	23.58±1.25	58.53±3.94
HFD diet						
12 weeks	35.89±4.54	77.15±4.97*	28.69±0.81	56.38±14.57	29.52±1.55	78.1±6.85
24 weeks	44.95±6.00	142.65±38.41*	13.49±1.87	108.05±32.01	22.21±2.97	145.97±47.84

AAV indicates adeno-associated virus; ANOVA, analysis of variance; HFD, high-fat-diet; LDL, low-density lipoprotein; and tChol, total cholesterol.

\**P* < 0.001 versus AAV-PCSK9<sup>DY</sup> by 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test; means±SEM; n=4–6.





**Figure 5.** Representative Masson's trichrome (**A**) and Oil Red O (**B**) staining in aortic root sections from high-fat-diet (HFD)-fed AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> (D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant)-transduced C57BL/6J, 129/SvPasCrlf, and FVB/NCrl mice. Scale bars, 100  $\mu$ m (**A** and top row in **B**) and 50  $\mu$ m (bottom row of magnified views in **B**). **C**, Quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in Oil Red O-stained aortic sections from **B**. AAV indicates adeno-associated virus.

AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup>-transduced *ApoE*<sup>-/-</sup> mice at least double the size of those in single mutants on the same diet (Figure 7B), without significantly altering serum cholesterol levels (Figure 6).

## Discussion

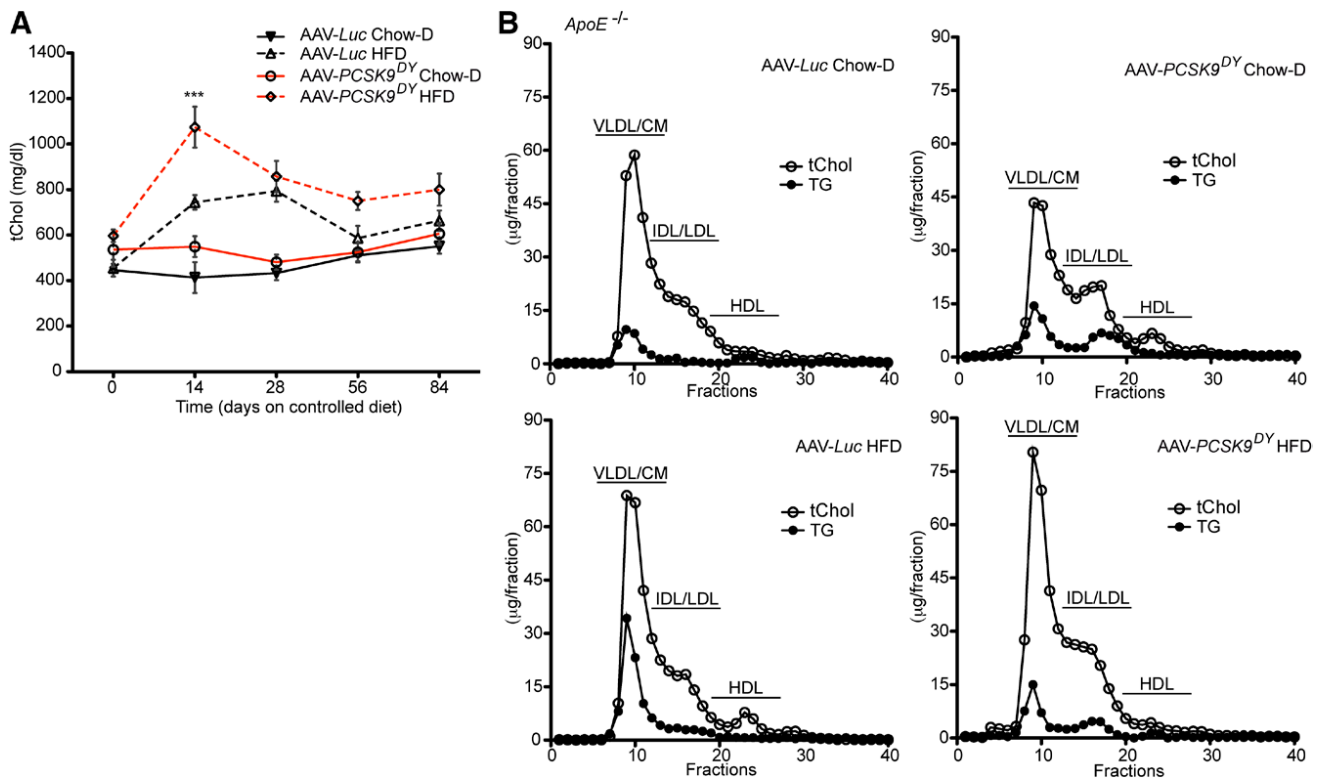
Our data demonstrate that AAV-mediated long-term gain-of-function of human *PCSK9* in mice provides a versatile model of dyslipidemia and atherosclerosis, established with a single intravenous injection. Recombinant AAV vectors support long-term transgene expression in many animal models<sup>22,36,37</sup> and humans.<sup>20</sup> Highly attractive features of AAV vectors include their tropism for postmitotic as well as mitotic cells, their intracellular genetic stabilization as predominantly non-integrated DNA, and their low immunogenicity.<sup>38</sup> One major advantage of AAV-mediated transexpression is its robust stability after a single administration. The clear association between hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in the AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> model could be easily used to test genetic interactions in combination with new transgenic or knockout models without the need for tedious, costly, and time-consuming backcrosses, as we have demonstrated here with the *ApoE*<sup>-/-</sup> mice.

*PCSK9* binds to the low-density lipid receptor family members LDLR, VLDLR, and apolipoprotein receptor-2

(ApoER2)<sup>39</sup> and targets them for degradation.<sup>40</sup> It is possible that the increase in VLDL/CM fractions observed in AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup>-infected mice when fed the HFD, together with the minor change in the IDL/LDL fractions, could be mediated by these last 2 receptors. Furthermore, VLDLR knockout mice have normal plasma lipoprotein levels when fed a chow diet.<sup>41</sup> However, in HFD, these mice show a slight increase in circulating triglyceride,<sup>42,43</sup> similar to what is observed in HFD-fed *PCSK9*<sup>DY</sup>-transduced mice.

The hypercholesterolemia model presented here is based on the expression of a pathological variant of human *PCSK9* in wild-type animals. Expression of *PCSK9*<sup>DY</sup> induced the accumulation of endogenous *PCSK9* protein without any evident change in mRNA levels. We propose that this alteration might be induced by the sequestration of LDLR by mutant *PCSK9*<sup>DY</sup>, rendering it unable to interact with mouse *PCSK9*. The endogenous *PCSK9* would therefore not be recycled and degraded, increasing its total serum levels (Figure IV in the online-only Data Supplement).

AAV-*PCSK9* expression induces only a modest increase in IDL/LDL levels (Figure III in the online-only Data Supplement), contrasting with the strong effect of AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> in wild-type C57BL/6J mice fed standard chow or HFD (Figure 3C). Nonetheless, AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup>-injected mice do not develop plaques spontaneously on the chow diet



**Figure 6. A,** Serum levels (mg/dL) of total cholesterol (tChol) in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice transduced with AAV-*Luc* or AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> (D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant) 30 days before starting the analysis (time 0). Mice were maintained for the indicated periods on chow or high-fat-diet (HFD). Blood was obtained after overnight fasting. \*\*\**P* < 0.001; ns, *P* > 0.05 versus AAV-*Luc* or AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> on chow diet (2-way ANOVA followed by Bonferroni post test; means ± SEM, n = 5–7). **B,** Fast protein liquid chromatography (FPLC) profile of tChol and triglyceride (TG) in pooled samples at the end of the experiment. AAV indicates adeno-associated virus; CM/VLDL, chylomicron and very low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; IDL/LDL, intermediate density lipoprotein.

and presented extensive lesions only when fed the HFD. In *ApoE*<sup>-/-</sup> mice fed a regular chow diet, AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> transduction has a marginal effect on serum lipoprotein levels, despite the doubling of plaque size compared with single *ApoE* mutants. A similar doubling of plaque size is seen in AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup>-injected *ApoE*<sup>-/-</sup> mice fed the HFD. Our data suggest that ApoE is a key factor in atheroma plaque development and clearly uncouples lipid cholesterol levels from plaque size measured at the aortic root.

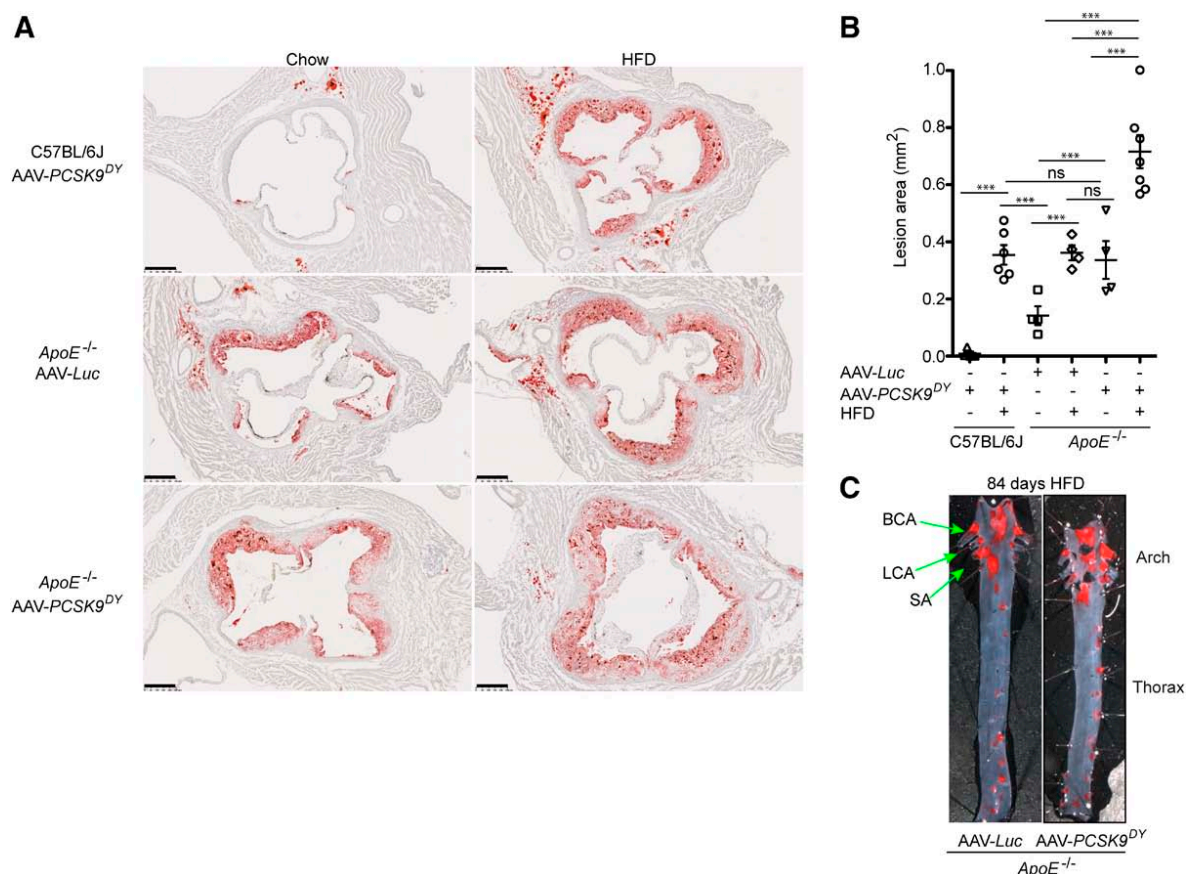
Our long-term results demonstrate induction of persistent hyperlipidemia over 1 year follow-up. AAV-mediated liver-specific *PCSK9*<sup>DY</sup> transfer induced hyperlipidemia in 100% of injected animals, with no hepatotoxicity or signs of inflammatory response activation. These data are consistent with several ongoing or completed phase I/II clinical trials that show an absence of adverse hepatic events.<sup>20,44</sup> These data suggest that the AAV-*PCSK9*<sup>DY</sup> transfer strategy is a robust approach for inducing stable liver-specific expression.

Because the link between gain-of-function mutations in *PCSK9* and autosomal dominant hypercholesterolemia was made 10 years ago, drug-development strategies for hypercholesterolemia have targeted PCSK9.<sup>45</sup> These strategies involve either reducing PCSK9 production or blocking circulating PCSK9 with neutralizing antibodies.<sup>46–49</sup> A major advantage of our AAV-injection model is that it

is easily applicable in any genetic background in a cost-effective manner. This feature makes this system an ideal inhibitor test platform for PCSK9 in multiple genetic contexts.

In summary, we think that AAV transfer methodology has the potential to make valuable contributions to the specific understanding of hyperlipidemia and atherosclerosis and to disease modeling in general. The ability to transexpress human disease-causing mutated genes in a tissue-specific manner in wild-type mice obviates the need for complex backcrosses, nonphysiological gene mutations, and the maintenance of large colonies of genetically modified animals. Moreover, the requirement for small numbers of readily available wild-type animals fits with public concerns and the minimal-use concept expressed in the 3 Rs (3Rs) principle for the rational use of animals in research: Replacement, referring to the use of nonanimal methods; Reduction, referring to the use of fewer animals to obtain comparable information; and Refinement, referring to methods that alleviate or minimize potential suffering or distress. We further envision that the AAV-based approach for gene transfer described here is suitable for general use in studies for which expression of any given gain-of-function transgene induces a disease phenotype and is especially applicable to the generation of disease models in larger animals.





**Figure 7.** **A**, Representative Oil Red O–stained images from AAV-transduced C57BL/6J and ApoE<sup>-/-</sup> mice maintained on high-fat-diet (HFD) or chow diet for 84 days. Scale bars, 250  $\mu$ m. **B**, Quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in Oil Red O–stained aortic sections from **A**. \*\*\* $P$ <0.001; ns,  $P$ >0.05 by 1-way ANOVA with Tukey multiple comparison test ( $n$ =4–7). Each data point denotes an aortic sinus section from an individual mouse, horizontal red bars denote mean values, and black bars denote SEM. **C**, Representative *en face* Oil Red O–staining of aortas from ApoE<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-PCSK9<sup>DY</sup> (D374Y proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mutant) or AAV-Luc and maintained on an HFD for 84 days. BCA indicates brachiocephalic artery; LCA, left carotid common artery; and SA, subclavian artery.

### Acknowledgments

We thank M. Torres for helpful discussion and advice, the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Viral Vectors Unit for help with AAV packaging, M.J. Andrés and R.B. Doohan for tissue sample preparation, A. de Molina for anatomopathological analysis, V. Zorita and A. Benítez-Sousa for mouse work, and S. Bartlett for text editing.

### Sources of Funding

The CNIC is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the Pro-CNIC Foundation. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (BFU2012-35258 grant to J.A. Bernal, Ramón y Cajal Program grant RYC-2009-04341 to J.A. Bernal, and FIS10/02268 to B. Ibáñez).

### Disclosures

None.

### References

- Domanski M, Lloyd-Jones D, Fuster V, Grundy S. Can we dramatically reduce the incidence of coronary heart disease? *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:721–725.
- Fuster JJ, Castillo AI, Zaragoza C, Ibáñez B, Andrés V. Animal models of atherosclerosis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;105:1–23.
- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341–355.
- Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503–516.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4431–4435.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71:343–353.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92:883–893.
- Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, Suen KF, Trauger JW, Spraggon G, Lesley SA, Liao G, Yowe D, Harris JL. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J*. 2007;406:203–207.
- Dubuc G, Tremblay M, Paré G, Jacques H, Hamelin J, Benjannet S, Boulet L, Genest J, Bernier L, Seidah NG, Davignon J. A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J Lipid Res*. 2010;51:140–149.
- Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004;65:419–422.
- Phan BA, Toth PP. Is the future of statins aligned with new novel lipid modulation therapies? *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15:300.
- Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, Poirier S, Lazure C, Seidah NG, Prat A. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2012;125:894–901.
- Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:7100–7105.
- Abboud S, Karhunen PJ, Lütjohann D, Goebeler S, Luoto T, Friedrichs S, Lehtimäki T, Pandolfo M, Laaksonen R. Proprotein convertase subtilisin/

- kexin type 9 (PCSK9) gene is a risk factor of large-vessel atherosclerosis stroke. *PLoS One*. 2007;2:e1043.
15. Abifadel M, Guerin M, Benjannet S, et al. Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2012;223:394–400.
  16. Tang Z, Jiang L, Peng J, Ren Z, Wei D, Wu C, Pan L, Jiang Z, Liu L. Pcsk9 sirna suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of nf-kappab activation in thp-1-derived macrophages. *Int J Mol Med*. 2012;30:931–938.
  17. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, Skolnick MH, Hopkins PN, Hunt SC, Shattuck DM. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*. 2004;114:349–353.
  18. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:413–419.
  19. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 2012;507:229–254.
  20. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, Hajjar RJ. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res*. 2014;114:101–108.
  21. Borel F, Kay MA, Mueller C. Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol Ther*. 2014;22:692–701.
  22. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang FX, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res*. 2012;95:460–468.
  23. Mbikay M, Mayne J, Chrétien M. Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9, an enzyme turned escort protein: hepatic and extra hepatic functions. *J Diabetes*. 2013;5:391–405.
  24. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*. 2006;116:2995–3005.
  25. Fasano T, Sun XM, Patel DD, Soutar AK. Degradation of LDLR protein mediated by ‘gain of function’ PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis*. 2009;203:166–171.
  26. Herbert B, Patel D, Waddington SN, Eden ER, McAleenan A, Sun XM, Soutar AK. Increased secretion of lipoproteins in transgenic mice expressing human D374Y PCSK9 under physiological genetic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1333–1339.
  27. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34:154–156.
  28. Al-Mashhadi RH, Sørensen CB, Kragh PM, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Sci Transl Med*. 2013;5:166ra1.
  29. Kourimate S, Chétièveaux M, Jarnoux AL, Lallanne F, Costet P. Cellular and secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 catalytic activity in hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2009;206:134–140.
  30. Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, Meuse L, Ye X, Thompson AR, Kay MA. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*. *Mol Ther*. 2000;1:522–532.
  31. Dansky HM, Charlton SA, Sikes JL, Heath SC, Simantov R, Levin LF, Shu P, Moore KJ, Breslow JL, Smith JD. Genetic background determines the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1960–1968.
  32. Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ. Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1480–1497.
  33. van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Wieringa B, Frants RR, Havekes LM, Hofker MH. Variability in cholesterol content in serum and aortic tissue in apolipoprotein E-deficient mice is comparable in inbred (129/Sv) and outbred (mixed 129/Sv and C57BL/6) mice. *Atherosclerosis*. 1995;118:165–167.
  34. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2008;48:646–654.
  35. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*. 1994;93:1885–1893.
  36. Kaspar BK, Roth DM, Lai NC, Drumm JD, Erickson DA, McKimman MD, Hammond HK. Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus. *J Gene Med*. 2005;7:316–324.
  37. Suhy DA, Kao SC, Mao T, et al. Safe, long-term hepatic expression of anti-HCV shRNA in a nonhuman primate model. *Mol Ther*. 2012;20:1737–1749.
  38. Büeler H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem*. 1999;380:613–622.
  39. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375:69–73.
  40. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, Seidah NG. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*. 2008;283:2363–2372.
  41. Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8453–8457.
  42. Goudriaan JR, Tacke PJ, Dahlmans VE, Gijbels MJ, van Dijk KW, Havekes LM, Jong MC. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1488–1493.
  43. Tacke PJ, Teusink B, Jong MC, Harats D, Havekes LM, van Dijk KW, Hofker MH. LDL receptor deficiency unmasks altered VLDL triglyceride metabolism in VLDL receptor transgenic and knockout mice. *J Lipid Res*. 2000;41:2055–2062.
  44. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006;12:342–347.
  45. Cariou B, Le May C, Costet P. Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis*. 2011;216:258–265.
  46. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, Smith WB, Lisbon E, Gutierrez M, Webb C, Wu R, Du Y, Kranz T, Gasparino E, Swergold GD. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2012;366:1108–1118.
  47. Catapano AL, Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. *Atherosclerosis*. 2013;228:18–28.
  48. Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:273–293.
  49. Stein EA, Gipe D, Bergeron J, Gaudet D, Weiss R, Dufour R, Wu R, Pordy R. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380:29–36.

## Significance

Hypercholesterolemia and associated atherosclerosis are leading causes of morbidity and mortality worldwide. Animal models of atherosclerosis are essential investigative tools for expanding our understanding of the disease; however, the generation and maintenance of genetically modified mouse colonies for research is costly. We have developed an alternative method that uses adeno-associated virus vectors, widely used for gene therapy approaches, to express the disease-causing dominant-negative PCSK9<sup>DY</sup> mutant to generate a model of hyperlipidemia and atherosclerosis in wild-type mice. Single systemic injection of AAV-PCSK9<sup>DY</sup> virus is more versatile, cost-effective, simpler, and time-efficient than transgenic approaches for generating hypercholesterolemic animals. These data suggest AAV-PCSK9<sup>DY</sup>-transformed mice could become an advantageous platform for testing specific PCSK9-targeted therapies and demonstrate that adeno-associated virus-transfer methodology has the potential to make valuable contributions to the specific understanding of hyperlipidemia and atherosclerosis and to disease modeling in general.

## ARTICLE OPEN

## Intravenous delivery of adeno-associated virus 9-encoded IGF-1Ea propeptide improves post-infarct cardiac remodelling

Enrique Gallego-Colon<sup>1</sup>, Maria Villalba<sup>2</sup>, Joanne Tonkin<sup>1</sup>, Francisco Cruz<sup>2</sup>, Juan Antonio Bernal<sup>2</sup>, Luis J Jimenez-Borreguero<sup>2</sup>, Michael D Schneider<sup>1</sup>, Enrique Lara-Pezzi<sup>1,2</sup> and Nadia Rosenthal<sup>1,3</sup>

The insulin-like growth factor Ea propeptide (IGF-1Ea) is a powerful enhancer of cardiac muscle growth and regeneration, also blocking age-related atrophy and beneficial in multiple skeletal muscle diseases. The therapeutic potential of IGF-1Ea compared with mature IGF-1 derives from its local action in the area of synthesis. We have developed an adeno-associated virus (AAV) vector for IGF-1Ea delivery to the heart to treat mice after myocardial infarction and examine the reparative effects of local IGF-1Ea production on left ventricular remodelling. A cardiotropic AAV9 vector carrying a cardiomyocyte-specific IGF-1Ea-luciferase bi-cistronic gene expression cassette (AAV9.IGF-1Ea) was administered intravenously to infarcted mice, 5 h after ischemia followed by reperfusion (I/R), as a model of myocardial infarction. Virally encoded IGF-1Ea in the heart improved global left ventricular function and remodelling, as measured by wall motion and thickness, 28 days after delivery, with higher viral titers yielding better improvement. The present study demonstrates that single intravenous AAV9-mediated IGF-1Ea Gene Therapy represents a tissue-targeted therapeutic approach to prevent the adverse remodelling after myocardial infarct.

*npj Regenerative Medicine* (2016) **1**, 16001; doi:10.1038/npjregenmed.2016.1; published online 9 June 2016

## INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) are mainly disorders of the blood vessels and the heart, and are the number one cause of death globally.<sup>1</sup> Among the most common types of CVD, ischemic injury leading to left ventricular (LV) dysfunction is a major cause of mortality.<sup>2,3</sup> Current interventions<sup>4</sup> for ischemic injury are targeted at physical removal of the obstructions of the heart vessels to restore blood flow to ischemic tissue. Paradoxically, reperfusion of the tissue leads to increased radical oxygen species production, which potentially causes adverse effects on the surviving myocardium.<sup>5</sup> Over the past decades, treatment for myocardial ischemia has made significant progress; unfortunately, myocardial infarction remains an unsolved therapeutic target.

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1),<sup>6</sup> an FDA-approved treatment for short-stature in children, has been extensively tested for its therapeutic properties in the resolution of tissue injury.<sup>7</sup> In adults, serum IGF-1 is mainly secreted by the liver and functions as an endocrine mediator of growth and metabolism.<sup>8</sup> IGF-1 is also transiently produced upon injury on most cell types to act locally in an autocrine and paracrine manner where it regulates cellular survival, proliferation and differentiation, but the molecular basis of these diverse functions is not well understood.<sup>9</sup> Using mouse transgenesis supplemental expression of a locally acting IGF-1 Ea propeptide (IGF-1Ea) promoted efficient tissue repair of skeletal muscle without scar tissue formation by increasing fibre size and muscle size hypertrophy, reducing cachexia, ageing, increasing the number of myogenic progenitors and promoting the fusion of nascent myocytes.<sup>10–12</sup> Furthermore, it has been demonstrated that IGF-1 accelerates muscle regeneration by modulating inflammatory cytokines and macrophage polarisation during

muscle regeneration.<sup>13,14</sup> In the heart, transgenic IGF-1Ea restored heart functionality post-infarct, increasing anti-apoptotic signalling and reducing scar formation facilitated by the modulation of the innate immune cell populations soon after infarction, favouring a reduction in inflammatory myeloid cells, modulating cytokine expression and matrix turnover within the first 7 days after infarct.<sup>15,16</sup> These studies suggest how supplemental IGF-1Ea, expressed locally, can modulate the stimulus of injury or disease, by mobilising immune cells to target and rebuild damaged tissues in a new paradigm of self-renewal. However, the heart-specific transgene is expressed from the time of cardiac myogenesis onward, and does not simulate delivery to humans in the clinic.

In the present study, we tested adeno-associated virus (AAV)-9 as a therapeutically relevant vector for promoting heart repair with IGF-1Ea. In recent years, the use of AAV has proved to be the most promising gene delivery system for the transfer of genes to post-mitotic cells *in vitro* and *in vivo*.<sup>17–19</sup> So far, high efficiency whole-heart gene delivery in small animals has only been effectively achieved with AAV serotype 9.<sup>20,21</sup> We therefore exploited intravenous delivery of an AAV9-based IGF-1Ea gene vector to ameliorate the adverse effects of the heart remodelling after ischemic injury, as a clinically applicable delivery system.

## RESULTS

## Characteristics of intravenous AAV9.IGF-1Ea gene transfer

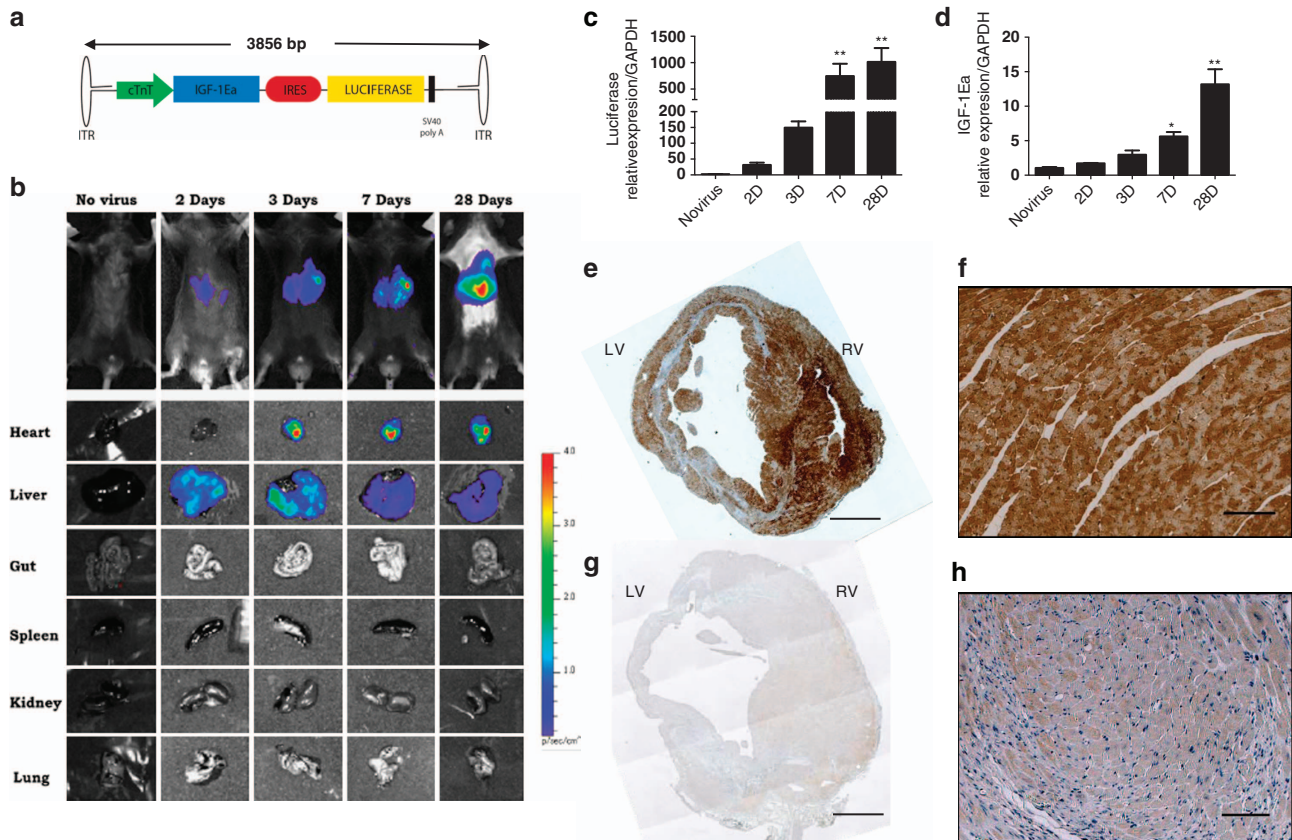
To evaluate the therapeutic potential of AAV9-mediated IGF-1Ea gene transfer, we constructed an AAV9 vector encoding the IGF-1Ea mouse complementary DNA (cDNA), the expression of which was driven by the cardiac troponin promoter (cTNT). The

<sup>1</sup>Imperial Centre for Translational Research, National Heart and Lung Institute, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, UK; <sup>2</sup>Cardiovascular Development and Repair Department, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain and <sup>3</sup>Australian Regenerative Medicine Institute/EMBL Australia, Monash University, Melbourne, VIC, Australia.

Correspondence: E Gallego-Colon (egallego@imperial.ac.uk)

Received 16 September 2015; revised 16 December 2015; accepted 8 January 2016





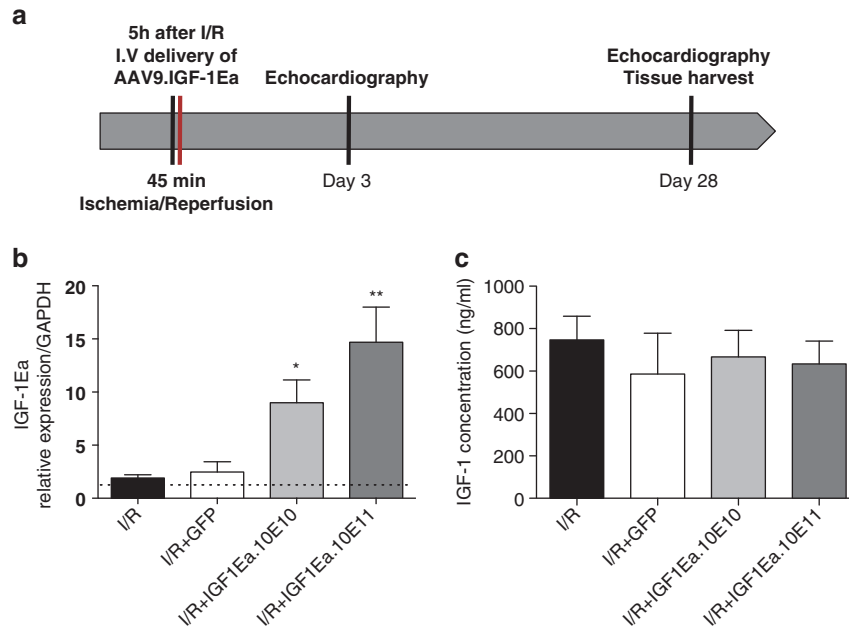
**Figure 1.** Time course of AAV9 vector mediated IGF-1Ea gene expression in the murine heart after intravenous injection. **(a)** Schematic representation of recombinant AAV vector. The construct contains the mouse IGF-1Ea gene (462 bp) and an internal ribosomal entry site (IRES) followed by the firefly luciferase reporter gene. The expression of this bi-cistronic DNA is under the control of the cardiac troponin promoter (cTNT), and the SV40 polyA signal, flanked by inverted terminal repeats (ITR), shown as hairpin loops. The AAV vectors (AAV9.GFP and AAV9.IGF-1Ea) were packaged into AAV9 capsids. **(b)** Bioluminescence imaging of uninjured mice illustrating the distribution of luciferase after AAV9.IGF-1Ea administration ( $3.5 \times 10^{11}$  genome copies). *Ex vivo* bioluminescence images at indicated times of various tissues (heart, liver, gut, spleen, kidney and lungs) after IGF-1Ea cardiac gene transfer. Quantitative qPCR analysis of **(c)** luciferase and **(d)** IGF-1Ea in the heart at several timepoints after injection of I/R+IGF1Ea. $10^{11}$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . One-way ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison test. I/R group (no viral treatment group) as control group. **(e–h)** Immunohistochemistry of luciferase expression in heart sections 28 days after I/R in **e**, **f** AAV9.IGF-1Ea  $3.5 \times 10^{11}$  GC injected 5 h after I/R. **(e)** whole heart and **(f)**  $40 \times$  magnification. **(g, h)** no virus (I/R) group, **(g)** whole heart and **(e)**  $\times 40$  magnification. **(d, e)** Scale bar, 1 mm. **(e–g)** Scale bar, 250  $\mu$ m. LV, left ventricle; RV, right ventricle. Mean values  $\pm$  s.e.m. are shown.

plasmid also contained an internal ribosomal entry site for the luciferase gene (Figure 1a), allowing gene delivery to be readily assayed. We first assessed transduction levels by administering  $3.5 \times 10^{11}$  GC of AAV9.IGF-1Ea in a single intra-femoral vein injection to C57BL/6 mice. The *in vivo* expression of luciferase was evaluated at different time points. Significant expression of luciferase *in vivo* was seen in the heart at 7 days post-injection. Ectopic expression in the liver was detected albeit at much lower levels than in the heart, as early as 2 days post-injection (Figure 1b), temporarily overriding the specificity of the cTNT promoter. *Ex vivo* imaging detected luciferase expression in the heart as early as 3 days post-injection (Figure 1c and Supplementary Figure S1A,B). Further analysis revealed that the emission of photons at 3 days may be blocked by the tissue thickness and composition of the chest (Supplementary Figure S1C). Quantitative analysis of luciferase and IGF-1Ea expression verified increased levels of messenger RNA (mRNA) by 3 days post-injection, however, IGF-1Ea levels were not significantly induced until 7 days post-injection (Figure 1c,d). By contrast, there was no difference in IGF-1Ea expression between control and AAV9.IGF-1Ea groups in the liver and lung (Supplementary Figure S2A,B). Immunohistochemistry for luciferase confirmed extensive expression throughout the heart with a

mosaic pattern (Figure 1e–h) typical of AAV gene transfer.<sup>22</sup> In conclusion, cardiac expression of IGF-1Ea starting between 3 and 7 days after injection exhibited robust and sustained gene expression, and bioluminescent imaging of luciferase was a faithful indicator of co-expressed IGF-1Ea.

#### AAV9.IGF-1Ea Gene transfer improves global left ventricular function after ischemia/reperfusion

To test the efficacy of virally delivered IGF-1Ea in ameliorating the response to cardiac injury, mice underwent myocardial ischemia for 45 min followed by reperfusion. Four groups of animals were compared; mice with no viral treatment (ischemia/reperfusion (I/R)) and a group receiving  $3.5 \times 10^{11}$  GC AAV9.GFP (I/R+GFP) were used as negative-control groups; two different viral titres groups for AAV9.IGF-1Ea were tested,  $3.5 \times 10^{10}$  GC and  $3.5 \times 10^{11}$  GC (I/R+IGF-1Ea. $10^{10}$  and I/R+IGF-1Ea. $10^{11}$ ), respectively. AAV9 administration was performed 5 h after surgery by intrafemoral vein injection and mice were killed 28 days after injection (Figure 2a). A significant dose-dependent increase in IGF-1Ea mRNA levels was observed in those groups that received the AAV9.IGF-1Ea treatment (Figure 2b). ELISA quantification revealed no differences in IGF-1 serum levels between groups (Figure 2c),



**Figure 2.** AAV9.IGF-1Ea gene transfer experimental design. **(a)** AAV9.IGF-1Ea was administered intravenously, 5 h after Ischemia/Reperfusion (I/R) and echocardiographic measurements were performed at 3 days and 28 days after I/R. Organs were collected at 28 days for analysis. **(b)** IGF-1Ea mRNA levels in the heart 28 days after cardiac gene transfer were quantified by qRT-PCR.  $n = 5-12$  per group. **(c)** IGF-1 Serum levels 28 days post-I/R.  $n = 6-12$  per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . One-way ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison test. I/R group (no viral treatment group) as control group. Mean values  $\pm$  s.e.m. are shown.

confirming, our previous study, that IGF-1Ea strongly adheres into extracellular matrix, retaining the propeptides locally, preventing their release into the circulation, and minimising the potential hazard of ectopic effects.<sup>23</sup>

Echocardiographic analysis 28 days after I/R revealed improved left ventricular ejection fraction in mice treated with AAV9.IGF-1Ea (I/R+IGF1Ea.10<sup>10</sup> and I/R+IGF-1Ea.10<sup>11</sup>) compared with untreated mice and mice treated with AAV9.GFP (Figure 3a and Supplementary Table S1). Left ventricular (LV) volume, as measure of LV dilation, in IGF-1Ea overexpressing mice at 28 days was also improved compared with LV volume at 3 days in the same group. In addition, AAV9.IGF-1Ea treated mice showed reduced LV dilation 28 days post-I/R (Figure 3b,c and Supplementary Table S1) compared with I/R and I/R+GFP groups. All four groups showed similar functional worsening in cardiac parameters and chamber dilation 3 days post-I/R regardless of the treatment, suggesting that initial infarct size was analogous among all groups (Supplementary Table S1). Notably, functional improvement was more evident in those groups where the highest AAV9.IGF-1Ea viral titre was administered.

#### Regional left ventricular wall motion is enhanced by 28 days after AAV9.IGF-1Ea gene transfer

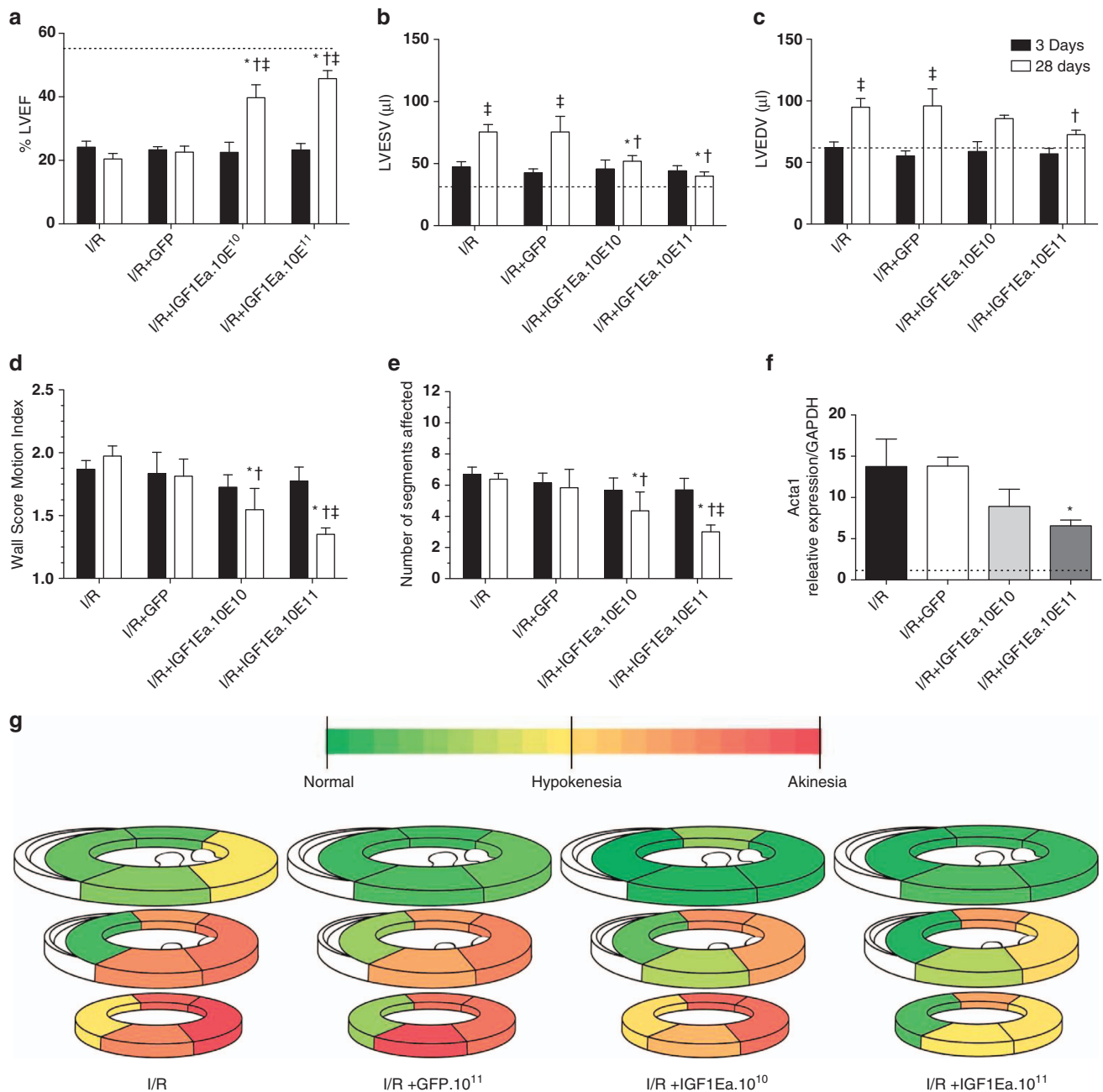
We performed quantitative evaluation of LV regional wall motion after infarction using echocardiography. Consistent with the LV functional data, an improvement in the wall score motion index was observed in those groups that received AAV9.IGF-1Ea (Figure 3d) and a reduction in the number of segments with altered motility (Figure 3e). Moreover, mice overexpressing IGF-1Ea showed fewer akinetic segments compared to I/R and I/R+GFP control groups (Figure 3g). In support of the functional data, levels of the heart failure marker Acta1 were significantly reduced with AAV9.IGF-1Ea treatment (Figure 3f). In agreement with our evidence that initial infarct size was not changed, no significant difference was observed between the different groups for either wall score motion index or individual segment

assessment at 3 days post-I/R (Supplementary Table S1). Both the wall score motion index and the contraction assessment indicate that AAV9.IGF-1Ea treatment improves the overall contractile function of the heart.

#### AAV9.IGF-1Ea gene transfer reduces infarct size and cardiac fibrosis

We performed histological analysis to determine infarct size, infarct expansion and scar thickness after AAV9.IGF-1Ea treatment. Improved cardiac function in the AAV9.IGF-1Ea groups was accompanied by thicker scars when compared with the no viral treatment (I/R) and I/R+GFP control groups (Figure 4a), along with a reduction in total heart fibrosis (Figure 4b). Scar length was also diminished in the IGF-1Ea-treated groups (Figure 4c), suggesting reduced infarct expansion. Functional and histological findings were confirmed at molecular level by monitoring LV fibrosis markers such as collagen 1 (Col1a1), collagen 3 (Col1a3), lysyl oxidase (Lox) and Thy1/CD90. Measured 28 days after IGF-1Ea cardiac gene transfer, the Col1a1/Col1a3 mRNA ratio was increased in the AAV9.IGF-1Ea groups (Figure 4d and Supplementary Figure S3A), indicating a difference in extracellular matrix composition. Higher levels of Lox were detected. Lox acts as crosslink molecule between collagen and elastin molecules into mature fibres (Figure 4e) potentially strengthening the scar. As a measurement of fibroblast proliferation, we quantified Thy1/CD90 levels, which were increased in the AAV9.IGF-1Ea group (Figure 4f). No changes were observed in the macrophage marker CD68 (Supplementary Figure S3B).

Interestingly, scars of AAV9.IGF-1Ea treated group were characterised by higher cardiomyocyte content (Figure 4g-j). To assess the generation of new myocardial tissue in the infarcted hearts, mice were given BrdU for 28 days to visualise cumulative DNA synthesis. Consistent with observations in cardiac-specific IGF-1Ea transgenic mice,<sup>16</sup> the I/R+AAV9.IGF-1Ea.10<sup>11</sup> group moderately increased percentage of BrdU-positive cardiomyocytes at 28 days post-I/R (Figure 5a-c). Phospho-H3 staining, a mitosis

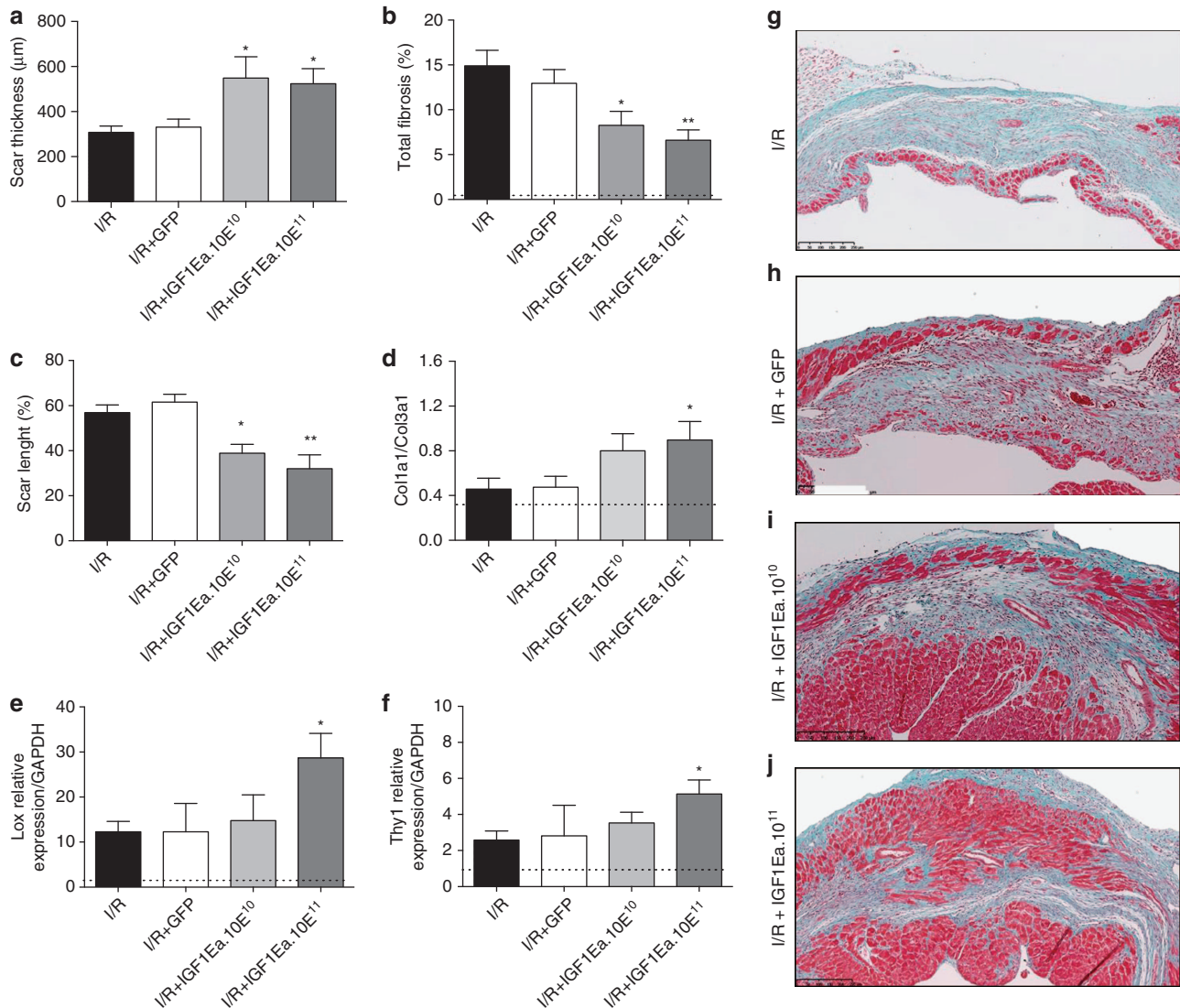


**Figure 3.** IGF-1Ea gene transfer improves cardiac function and reduces LV dilation after I/R. (**a–c**) Animals were analyzed by echocardiography 3 and 28 days post-I/R. (**a**) LV ejection fraction and (**b, c**) LV end-systolic and end-diastolic volumes, (**d**) wall motion index (WSMI) and (**e**) number of segments affected were determined. (**f**) mRNA levels of  $\alpha$ -skeletal actin in the remote myocardium analyzed by qRT-PCR. (**g**) Segment analysis based on wall motion and thickening. Segment scores are color coded from green to red representing: normal or normal = green, hypokinesia = yellow, akinesia = red. Black bars: 3 days after I/R, white bars: 28 days post I/R. n = 7-13. \**P* < 0.05 I/R versus AAV9, GFP, AAV9.IGF-1Ea groups. One-way ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison post-test. †*P* < 0.05. Two-way ANOVA to compare the 4 groups with Bonferroni post-tests. ‡*P* < 0.05. Two-way ANOVA to compare 3 days versus 28 days with Bonferroni post-tests. The dashed line shows the ejection fraction of basal group. LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume. Mean values ± s.e.m. are shown.

marker, did not reveal any significant difference between the groups at 28 days (Supplementary Figure S4), suggesting a lack of on-going proliferation at that stage. We also assessed whether IGF-1Ea gene transfer promoted enhanced vascularisation for proper blood supply to the scars. Indeed,  $\alpha$ SMA immunohistochemistry showed an increase in arterioles in the AAV9.IGF-1Ea-treated groups with the highest titre (Figure 5d–f). Histological

findings were confirmed by quantifying the mRNA levels of PECAM-1 (CD31) as marker vascular growth (Figure 5g). The greatest difference was obtained with the I/R+AAV9.IGF-1Ea.10<sup>11</sup> thus the higher viral titre was used in preceding experiments. As no significant differences were observed between the no viral treatment group (I/R) and the I/R+GFP control groups, only I/R is presented.





**Figure 4.** AAV9.IGF-1Ea treatment reduces infarct expansion and myocardial remodelling in AAV9.IGF-1Ea treated mice. (a) Scar thickness, (b) total fibrosis and (c) scar length were analysed 28 days post-I/R using histological methods. (d) Col1α1/Col3α1 ratio, (e) Lox and (f) Thy1 mRNA relative levels were analysed by qRT-PCR. (g–j) Representative masson's trichrome staining of infarct regions from all four groups. (g) I/R group, (h) I/R+GFP group, (i) I/R+IGF1Ea.10E<sup>10</sup> and (j) I/R+IGF1Ea.10E<sup>11</sup>.  $n = 5$ –12 per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . I/R versus all three groups. One-way ANOVA followed with Dunnett's post-test. Scale bar, 250 μm. Results are expressed as mean fold induction  $\pm$  s.e.m. over the values of uninjured hearts (dashed line).

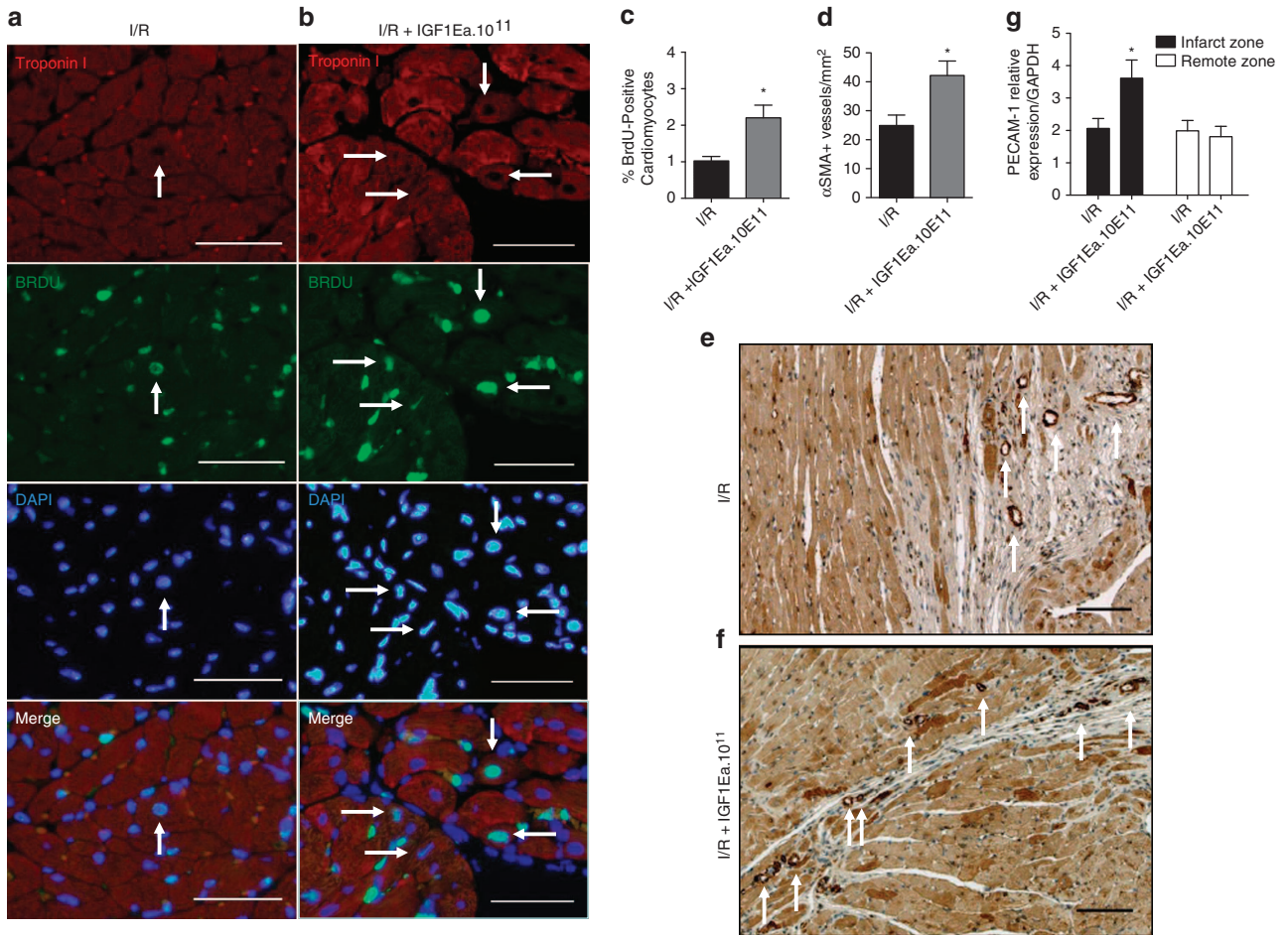
AAV9.IGF-1Ea treatment promotes cardiac Akt-mediated signalling. The main effects of IGF-1 are achieved through the Akt signalling pathway. In the heart, IGF-1 mediates Akt phosphorylation on the serine-473 residue, which indicates Akt activation.<sup>24</sup> AAV9.IGF-1Ea treatment increased IGF-1 protein content in the heart by 1.5-fold when compared with the I/R group. At 28 days post-I/R, mice treated with AAV9.IGF-1Ea exhibited a 1.7-fold increase in <sup>P-Ser473</sup>Akt. Phosphorylation of mTOR, downstream of Akt, was also increased by 1.8-fold after I/R in the AAV9.IGF-1Ea-treated groups (Figure 6a,b).

## DISCUSSION

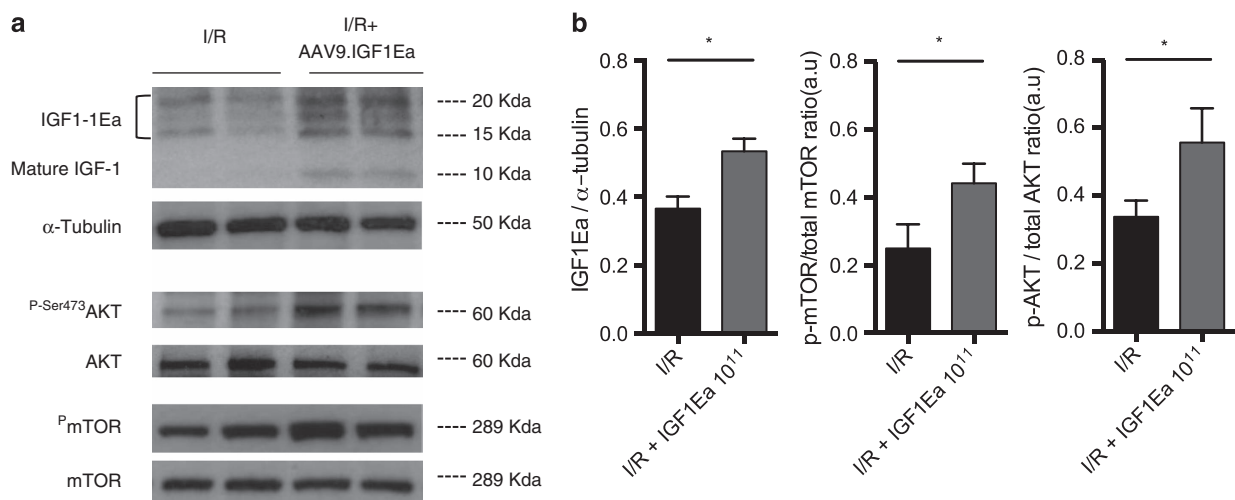
In this study, we have demonstrated for the first time that a single intravenous injection of AAV9.IGF-1Ea after ischemic injury induced improvements in LV cardiac function post-I/R through partial recovery of LV contraction and quality motion, reducing

total fibrosis and infarct expansion limiting adverse remodelling. Interestingly, analysis of the main extracellular matrix components, collagen 1 and collagen 3, showed a skewing in favour of collagen synthesis which may confer different mechanical and physical properties to the infarct. As with previous models of IGF-1 administration, the AAV9 virus was able to induce an increase in the formation of new capillaries.<sup>25</sup> Although the salutary effects of direct intramyocardial injection of IGF-1 expression vectors has been previously documented,<sup>25–27</sup> This is the first report of sustained effective improvement by virally encoded IGF-1Ea propeptide in a more therapeutically relevant delivery mode.

Over the years, the use of AAVs in preclinical<sup>28–30</sup> and clinical studies<sup>31,32</sup> has positioned AAVs as the vector of choice for cardiac gene transfer. This is mainly due to the diverse tissue tropism determined by the capsid serotype, the lack of pathogenicity, low immunogenicity and robust gene expression achieved with this system.<sup>19</sup> We also show that single administration of the AAV9 virus provided robust and early onset of IGF-1Ea expression in the



**Figure 5.** AAV9.IGF-1Ea increases the number of BrdU-positive cardiomyocytes in mice 28 post-I/R. **(a, b)** Representative confocal images of paraffin heart sections 28 days post-I/R. **(a)** I/R (no virus) and **(b)** AAV9.IGF-1Ea  $3.5 \times 10^{11}$  groups. Sections were stained with DAPI (blue, nuclei), anti-BrdU (green) and cardiac troponin I (red, cardiomyocytes). Scale bar, 100  $\mu$ m. White arrows indicate BrdU-positive nuclei. **(c)** Quantification of BrdU+ cardiomyocytes after *in vivo* labeling.  $n = 3-6$ . **(d)**  $\alpha$ SMA immunohistochemistry of **(e)** no virus group (I/R) and **(f)** AAV9.IGF-1Ea  $3.5 \times 10^{11}$  treated hearts after I/R. Scale bar, 100  $\mu$ m. **(g)** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) mRNA was analysed by qRT-PCR in the ischemic and remote myocardium.  $n = 4-6$  per group. Two-tailed Student's *t*-test was performed to compare I/R versus AAV9.IGF-1Ea  $3.5 \times 10^{11}$  28 days after myocardial infarction (MI). \* $P < 0.05$ . Mean values  $\pm$  s.e.m. are shown.



**Figure 6.** IGF-1Ea gene transfer activates the Akt signalling pathway. **(a)** Representative western blot images of protein extracts from the remote myocardium of I/R (untreated group) and AAV9.IGF-1Ea treated group 28 days post-I/R. **(b)** Western blot quantification of IGF-1Ea, p-Akt, and mTOR 28 days after cardiac transfer.  $n = 6-10$  per group. Two-tailed Student's *t*-test was performed to compare I/R versus AAV9.IGF-1Ea  $3.5 \times 10^{11}$  28 days after MI. \* $P < 0.05$ . Mean values  $\pm$  s.e.m. are shown.



heart, with the cTNT promoter proving sufficient to achieve therapeutic IGF-1Ea transcription after single systemic injection. AAV9-mediated luciferase gene expression was also detected in the liver at much lower levels, which overrode the cardiac specificity of the cTNT promoter.<sup>22,29,33</sup> However, this was not paralleled by an increase in IGF-1Ea mRNA levels in the liver after AAV9.IGF-1Ea treatment, indicating that IGF-1Ea overexpression was cardiac-specific. Notably, in this study, we show for the first time that the IGF-1Ea propeptide can be successfully delivered and overexpressed in the heart by Gene Therapy. The Ea moiety in the IGF-1Ea propeptide, which is efficiently cleaved, anchors IGF-1 to the extracellular matrix in other tissues preventing its clearance and reducing off-target effects.<sup>23</sup> This feature dampens the risks associated with elevated systemic IGF-1 levels such as hypotension<sup>34</sup> and hypoglycaemia.<sup>35</sup>

We have previously shown that cardiac overexpression of IGF-1Ea in transgenic mice resulted in repression of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6, while the anti-inflammatory IL-4 and IL-10 showed higher expression levels when compared with wild-type (WT) animals after cardiotoxin injury. We found that IGF-1Ea decreased the number of apoptotic cells at the injured site, which is at least in part attributable to the induction of UCP-1, metallothionein 2 and the cardioprotective cytokine adiponectin<sup>16</sup> reducing infarct size.

The diverse functions of IGF-1 are mediated through the same receptor (IGF-1R), which upon activation leads to the recruitment of other substrates that in turn activate different signal pathways.<sup>36,37</sup> Upon IGF-1R activation, active PI3-kinase phosphorylates inositol phospholipids.<sup>38,39</sup> This phosphorylation is required to induce several downstream targets such as Akt, which promotes protein synthesis and cell survival, among other functions. Although BrdU labelling showed increased percentage of positive cardiomyocytes in AAV9.IGF-1Ea-treated group, no differences were observed with Phospho-H3 staining at 28 days. IGF-1Ea also induces the expression of the calcineurin splicing variant CnA $\beta$ .<sup>40</sup> Interestingly, the effects of AAV9.IGF-1Ea are reminiscent of those of CnA $\beta$ 1 overexpression, which results in Akt activation, improved vascularisation of the infarct region and reduced infarct expansion leading to reduced remodelling and improved cardiac function post-infarction.<sup>41,42</sup>

In summary, this study demonstrates that intravenous delivery of AAV9.IGF-1Ea is effective in improving post I/R cardiac function, preventing infarct expansion and dilation. This is attributed to the combined effects of a cardiotropic gene delivery vehicle, AAV9 and the pleiotropic action of IGF-1Ea in the heart. The escalating incidence of acute cardiovascular disease leading to heart failure underscores the increasingly urgent need for improved therapeutic strategies to limit cardiac tissue damage and improve functional outcomes in translational settings. From a clinical standpoint, intravenous injection is the least invasive mode of delivery for cardiac Gene Therapy, although a higher efficiency would be achieved by delivering the AAV9.IGF-1Ea vector by intracoronary infusion during cardiac catheterisation in patients. These results provide a rationale to conduct additional studies in larger animals for translation to clinical application.

## MATERIALS AND METHODS

### Viral vector plasmids, production and purification

Self-complementary adeno-associated plasmid containing the IGF-1Ea cDNA was generated from a pA-cTNT-Luciferase plasmid kindly provided by Juan Bernal, CNIC, Madrid, Spain. Mus musculus IGF-1Ea consensus sequence was cloned into pA-cTNT-Luciferase backbone and construct integrity was confirmed by sequencing. AAV vectors were produced and purified by Penn Vector Core (University of Pennsylvania) as described.<sup>43</sup> The vector was subjected to vector genome titrations, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis for particle purity, and transgene expression analysis in HL-1 cells.

### Cardiac injury model

Myocardial infarction was induced by ischemia-reperfusion (I/R) in C57BL/6 male mice, 8 to 12 weeks old, obtained from Charles River. The infarcts were performed by ligation of the left coronary artery for 45 min followed by reperfusion of the artery. Surgeries were performed under general anesthesia with 3–3.5% sevoflurane and mechanical ventilation was provided during the procedure. The mortality rate in the first 24 h post-I/R was 38%; no mortality was found afterwards. Mice received analgesic treatment with buprenorphine (0.3 mg/kg, subcutaneously) after surgery. 1 mg/ml of bromodeoxyuridine (BrdU), was administered in the water of all four groups and renewed every 2 days.

### *In vivo* gene transfer

Five hours after I/R, mice were anaesthetised with 1.5–2.5% sevoflurane and 50  $\mu$ l of concentrated AAV vector (in phosphate-buffered saline) was injected intravenously through the left femoral vein using a 29-gauge insulin syringe. AAV9 administration was performed as follows. One group received  $3.5 \times 10^{11}$  genome copies (GC) of AAV9.GFP as a AAV control. For the IGF-1Ea gene transfer, two different viral titers were administered,  $3.5 \times 10^{10}$  GC and  $3.5 \times 10^{11}$  GC of AAV9.IGF-1Ea.

### Detection of serum IGF-1 protein

The sera from the four groups were utilised for measurements of total IGF-1 using a commercially available ELISA kit specific for rodent IGF-1 (Peprotech, London, UK, 900-K170). Calculations of IGF-1 content were based on a standard curve generated from recombinant mouse IGF-1. Total rodent IGF-1 was detected according to the manufacturer's instruction.

### Echocardiographic analysis

Transthoracic echocardiography and analysis was blindly performed at baseline, 3 and 28 days post-I/R injury in anaesthetised mice to evaluate LV systolic function, chamber dimensions, wall thickness, infarct size and wall motion. All measurements were carried out in accordance with the recommendations for chamber quantification from the American Society of Echocardiography in conjunction with the European Association of Echocardiography.<sup>41,44</sup> Left ventricle wall motion score index was calculated in order to assess global and regional cardiac function by a 12-based segment model, considering parasternal two-dimensional short and long axis views at 3 levels (base, middle and apex). In each level, the left ventricle was divided in 4 segments (anterior, lateral, inferior and septal) and each segment was scored according its severity in terms of contraction as 1 (normal), 2 (hypokinetic), 3 (akinetic), 4 (dyskinetic) and 5 (aneurysmal).<sup>44</sup> Number of segments affected is calculated as the number of segments with abnormal contractility out of the 12 segments of the heart (Score > 1). Cardiac score is the sum of the severity score of each segment. The colour-coded heart quantification is calculated as the average score of the same segment (anterior, lateral, inferior and septal from base, middle and apex) throughout all samples. Wall motion score index defined as the ratio of the sum of scored individual segment over the total number of segments evaluated. Infarct size was also estimated considering the mean of scored individual segments. For this study, 140 mice underwent I/R with a mortality rate of 38%. An exclusion criterion was pre-established taking into account that both large and small infarct influence the outcome depending on which group could randomly be allocated. Therefore, homogeneous infarct sizes were selected according to the following exclusion criteria: Only mice that presented two or more akinetic cardiac segments plus a LV ejection fraction below 45% at 3 days post-surgery were selected for the study. After applying the exclusion criteria, mice were randomly allocated to form the four groups. Further description of the echocardiographic methods can be found in Supplementary Materials.

### Bioluminescence analysis

Mice were anaesthetised with 1.5–2% isoflurane in oxygen. D-luciferin (Promega, Madison, WI, USA, E1601) at 100 mg/kg in saline was administered to mice by intraperitoneal injection. 5–10 min after D-luciferin administration, all mice were imaged in supine position using a Xenogen IVIS100 imaging system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Organs were immersed in D-luciferin for 1 min and bioluminescence was imaged immediately after using the IVIS 100 system. Photons emitted from the mice were collected and integrated for 1 min. Images were processed

using Living Image software (Caliper Life Sciences). Mean luminescence intensities (photons per  $\text{cm}^2 \text{sr}$ ) were measured from the regions of interest over the mouse hearts.

### Histology, immunohistochemistry and immunofluorescence

Scar length was determined in Masson's trichrome-stained sections using the midline method, which best correlates with functional measurements.<sup>45</sup> In this method, the infarct length is measured as the length of the midline of the infarcted wall, in which 50% of the wall thickness is composed of scar tissue. Scar length represents the percentage of infarct length with respect to the length of the whole LV circumference. Total fibrosis was quantified by ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) in whole heart images obtained at the middle section. Further description of Masson's, immunohistochemistry and immunofluorescence staining can be found in Supplementary Material.

### RNA isolation and quantitative reverse-transcriptase PCR

After sacrificing the mice, the hearts were perfused with phosphate-buffered saline, and samples from the infarct region, border zone and remote myocardium were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the RNeasy kit from Qiagen, with DNase digestion on the column. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) data were analysed using the LinReg (Amsterdam, Netherlands) software in order to estimate the efficiency rates and the Ct values.<sup>46</sup>

### Western blot

Western blot was performed using the following primary antibodies anti-phospho-Akt-Ser473 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-Akt (Cell Signaling), anti-phospho mTOR- Ser 2448 (Cell Signaling), anti-mammalian target of rapamycin (mTOR; Cell Signaling), IGF-1 (Sigma, Dorset, UK) and  $\alpha$ -Tubulin (Sigma) as previously described.<sup>47,48</sup> Brightness and contrast were linearly adjusted using power point.

### Statistics

Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. In addition, a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni post-test was applied to compare mice at 3 versus 28 days post-I/R. Group differences in qRT-PCR and histological quantifications were analysed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test to compare with untreated mice. Student's *t*-test or two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-test was performed to quantify vessels and western blot analysis. G\*Power 3.1 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, <http://www.gpower.hhu.de>) software was used to estimate sample size of each group after surgery with a 95% confidence level and 5% margin of error. Data were analysed with GraphPad-Prism 5.0 (Graphpad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), and differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . Further description of the statistical analysis can be found in Supplementary Material.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to E.L.P.'s group at the CNIC for excellent technical assistance and advice, and to members of the Rosenthal laboratory for critical discussion. We also thank the University of Pennsylvania, Penn Vector Core, for generating AAV9 vectors. This work was supported by grants from the European Union's Seventh Framework Programme Marie Curie Initial Training Network—CardioNet GA-289600 to N.R. and E.L.P., and British Heart Foundation grants—RM/13/1/30157 to N.R. E.L.P. was also supported by European Union's Seventh Framework Programme—CardioNext ITN-608027, CardioNet-ITN-289600, from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2012-31451) and from the Regional Government of Madrid (2010-BMD-2321 'Fibroteam'). E.G.C. gratefully acknowledges the support from the BritishSpanish Society (BSS) for the British-Spanish Society/Santander Universities 2015 fellowship that partially supported this project.

### CONTRIBUTIONS

Authorship of this manuscript follows the ICMJE criteria.

### COMPETING INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

- Go, A. S. *et al.* Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, e28–e292 (2014).
- Lee, D. S. *et al.* A systematic assessment of causes of death after heart failure onset in the community: impact of age at death, time period, and left ventricular systolic dysfunction. *Circ. Heart Fail.* **4**, 36–43 (2011).
- Yancy, C. W. *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines. *Circulation* **128**, 240–327 (2013).
- Deb, S. *et al.* Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous interventions in coronary revascularization. *JAMA* **310**, 2086 (2013).
- Zweier, J. L. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **263**, 1353–1357 (1988).
- Rotwein, P., Pollock, K. M., Didier, D. K. & Krivi, G. G. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J. Biol. Chem.* **261**, 4828–4832 (1986).
- Frindik, J. P. & Kemp, S. F. Managing idiopathic short stature: role of somatropin (rDNA origin) for injection. *Biologics* **4**, 147–155 (2010).
- Laron, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol. Pathol.* **54**, 311–316 (2001).
- D'Ercole, A. J., Stiles, A. D. & Underwood, L. E. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 935–939 (1984).
- Musarò, A. *et al.* Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* **27**, 195–200 (2001).
- Hill, M. & Goldspink, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* **549**, 409–418 (2003).
- Barton-Davis, E. R., Shoturma, D. I., Musaro, A., Rosenthal, N. & Sweeney, H. L. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 15603–15607 (1998).
- Pelosi, L. *et al.* Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J.* **21**, 1393–1402 (2007).
- Tonkin, J. *et al.* Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Mol. Ther.* **23**, 1189–1200 (2015).
- Gallego-Colon, E. *et al.* Cardiac-restricted IGF-1Ea overexpression reduces the early accumulation of inflammatory myeloid cells and mediates expression of extracellular matrix remodeling genes after myocardial infarction. *Mol. Inflamm.* **2015**, 484357 (2015).
- Santini, M. P. *et al.* Enhancing repair of the mammalian heart. *Circ. Res.* **100**, 1732–1740 (2007).
- Gregorevic, P. *et al.* Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* **10**, 828–834 (2004).
- Wang, Z. *et al.* Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* **23**, 321–328 (2005).
- Weitzman, M. D. & Linden, R. M. Adeno-associated virus biology. *Methods Mol. Biol.* **807**, 1–23 (2011).
- Pacak, C. A. *et al.* Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.* **99**, e3–e9 (2006).
- Bostick, B., Ghosh, A., Yue, Y., Long, C. & Duan, D. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther.* **14**, 1605–1609 (2007).
- Prasad, K.-M. R., Xu, Y., Yang, Z., Acton, S. T. & French, B. A. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther.* **18**, 43–52 (2011).
- Hede, M. S. *et al.* E-peptides control bioavailability of IGF-1. *PLoS ONE* **7**, e51152 (2012).
- Vinciguerra, M. *et al.* mIGF-1/JNK1/SirT1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart. *Aging Cell* **11**, 139–149 (2012).
- Dobrucki, L. W. *et al.* Analysis of angiogenesis induced by local IGF-1 expression after myocardial infarction using microSPECT-CT imaging. *J. Mol. Cell Cardiol.* **48**, 1071–1079 (2010).
- Davis, M. E. *et al.* Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 8155–8160 (2006).

27. Khan, R. S. *et al.* Targeting extracellular DNA to deliver IGF-1 to the injured heart. *Sci. Rep.* **4**, 4257 (2014).
28. Konishi, M., Kawamoto, K., Izumikawa, M., Kuriyama, H. & Yamashita, T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* **10**, 610–618 (2008).
29. Kaspar, B. K. *et al.* Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus. *J. Gene Med.* **7**, 316–324 (2005).
30. Müller, O. J. *et al.* Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* **70**, 70–78 (2006).
31. Zacchigna, S., Zentilin, L. & Giacca, M. Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system. *Circ. Res.* **114**, 1827–1846 (2014).
32. Chacon-Camacho, O. F. Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis. *World J. Clin. Cases* **3**, 112 (2015).
33. Fang, H. *et al.* Comparison of adeno-associated virus serotypes and delivery for cardiac gene transfer. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 234–241 (2013).
34. Cheng, P.-W. *et al.* Involvement of two distinct signalling pathways in IGF-1-mediated central control of hypotensive effects in normotensive and hypertensive rats. *Acta Physiol.* **212**, 28–38 (2014).
35. Kovacs, G. T. *et al.* Hypoglycemic effects of insulin-like growth factor-1 in experimental uremia: Can concomitant growth hormone administration prevent this effect? *Horm. Res.* **51**, 193–200 (1999).
36. Butler, A. A. *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **121**, p 19–26 (1998).
37. Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J. & Florini, J. R. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 6653–6662 (1997).
38. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N. & Walsh, K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* **101**, 660–667 (2000).
39. Rommel, C. *et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1009–1013 (2001).
40. Lara-Pezzi, E. *et al.* A naturally occurring calcineurin variant inhibits FoxO activity and enhances skeletal muscle regeneration. *J. Cell Biol.* **179**, 1205–1218 (2007).
41. López-Olañeta, M. M. *et al.* Induction of the calcineurin variant CnAβ1 after myocardial infarction reduces post-infarction ventricular remodelling by promoting infarct vascularization. *Cardiovasc. Res.* **102**, 396–406 (2014).
42. Santini, M. P. *et al.* IGF-1Ea induces vessel formation after injury and mediates bone marrow and heart cross-talk through the expression of specific cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 201–207 (2011).
43. Gao, G. *et al.* Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. *Mol. Ther.* **13**, 77–87 (2006).
44. Lang, R. M. *et al.* Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **18**, 1440–1463 (2005).
45. Takagawa, J. *et al.* Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J. Appl. Physiol.* **102**, 2104–2111 (2007).
46. Ruijter, J. M. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e45 (2009).
47. Blackstock, C. D. *et al.* Insulin-like growth factor-1 increases synthesis of collagen type I via induction of the mRNA-binding protein LARP6 expression and binding to the 5' stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **289**, 7264–7274 (2014).
48. Panse, K. D. *et al.* Follistatin-like 3 mediates paracrine fibroblast activation by cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 814–826 (2012).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies the paper on the *npj Regenerative Medicine* website (<http://www.nature.com/npjregenmed>)



# miR-300 mediates Bmi1 function and regulates differentiation in primitive cardiac progenitors

FM Cruz<sup>1</sup>, M Tomé<sup>1,2</sup>, JA Bernal<sup>1,3</sup> and A Bernad<sup>\*,1,2,3</sup>

**B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (Bmi1) is a polycomb-family transcriptional factor critical for self-renewal in many adult stem cells and human neoplasia. We sought to identify microRNAs regulated by Bmi1 that could play a role in multipotent cardiac progenitor cell (CPC) decisions. We found that miR-300, a poorly characterized microRNA mapping in the *Dlk1-Dio3* microRNA cluster, was positively regulated by Bmi1 in CPCs. Forced expression of miR-300 in CPCs promoted an improved stemness signature with a significant increase in Oct4 levels, a reduction in senescence progression and an enhanced proliferative status via p19 activation and inhibition of p16 accumulation. Endothelial and cardiogenic differentiation were clearly compromised by sustained miR-300 expression. Additionally, RNA and protein analysis revealed a significant reduction in key cardiac transcription factors, including Nkx2.5 and Tbx5. Collectively, these results suggest that some functions attributed to Bmi1 are due to induction of miR-300, which decreases the cardiogenic differentiation potential of multipotent CPCs *in vitro* and promotes self-renewal.**

*Cell Death and Disease* (2015) 6, e1953; doi:10.1038/cddis.2015.255; published online 29 October 2015

Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1), a member of polycomb repressive complex 1 (PCR1), is a transcription factor involved in multiple biological processes, including embryonic development, organ formation, tumorigenesis, and stem cell self-renewal and differentiation.<sup>1</sup> Deficiency in Bmi1 results in progressive postnatal growth retardation and neurological defects, confirming that Bmi1 is required for the self-renewal of stem cells in the peripheral and central nervous systems, but not for their survival or differentiation.<sup>2</sup> In the absence of Bmi1, the cyclin-dependent kinase inhibitor *p16Ink4a* is generally upregulated,<sup>2,3</sup> reducing the rate of cellular proliferation. *BMI1* is downregulated by replicative senescence in human fibroblasts and overexpression of *BMI1* extends replicative life span, correlating with *INK4A/ARF* deregulation.<sup>4</sup> *Bmi1* has been reported to play crucial roles during the self-renewal and maintenance of hematopoietic, intestinal, bronchioalveolar, pancreatic, prostate, lung, and epithelial stem cells<sup>2–6</sup> and more recently the tongue and rodent incisors.<sup>7</sup> Thus, *Bmi1* is possibly the most universal adult stem cell marker and a remarkable player in many cancer stem cells models.<sup>8,9</sup> In all models tested, *Bmi1* dependence seems to distinguish stem cell self-renewal from committed progenitor proliferation.<sup>2</sup>

Multiple functions have been ascribed to *Bmi1*, underscoring its broad importance in numerous processes. *Bmi1* facilitates the repression of *Hox* genes to prevent inappropriate differentiation and induces downregulation of Dickkopf (DKK) proteins, resulting in upregulation of the *Wnt* target *c-Myc*, which in turn leads to transcriptional autoactivation of

*Bmi1*.<sup>7</sup> Reinforcement of this positive feedback loop regulating *Bmi1* expression seems relevant in promoting cancer and maintaining the stem cell phenotype.<sup>9,10</sup> In addition, *Bmi1* is transcriptionally controlled by phosphorylated *Nanog*,<sup>11,12</sup> and is inhibited by a plethora of miRNAs that are significantly downregulated in cancer models.<sup>12</sup>

Extensive studies on primed differentiation of murine embryonic stem (ES) and adult stem cells have established that efficient stem cell maintenance requires a highly concerted regulation of gene expression,<sup>13,14</sup> involving both coding genes and noncoding RNAs (ncRNAs). Among the regulatory elements involved in stem cell function, Oct4 protein, encoded by the *Pou5f1* gene, is essential for the stemness properties of ES cells and is a key regulator of pluripotency in mammalian development. The Oct4 transcription factor is also indispensable for somatic cell reprogramming. Besides transcription factors, microRNAs (miRNAs) also play important roles in stem cell homeostasis. miRNAs are an abundant class of small ncRNAs that regulate the translation, stability, and localization of target messenger RNAs. Functional studies in ES cells have demonstrated critical roles for miRNAs, especially in regulating the balance between self-renewal and differentiation.<sup>14,15</sup> Less information is available about the role(s) of specific miRNAs in the regulation of adult stem cell systems, but some studies have explored possible collaborations; for example, miR-142-3p controls specification of definitive hemangioblasts during ontogeny.<sup>16,17</sup> Also, miR-21 strongly inhibits *SOX2* expression in human mesenchymal stem cells (MSCs), resulting in

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Development and Repair, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain and <sup>2</sup>Department of Immunology and Oncology, Spanish National Center for Biotechnology (CNB-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

\*Corresponding author: A Bernad, Department of Immunology and Oncology, Spanish National Center for Biotechnology (CNB-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Spain. Tel/Fax: +34 915854544; E-mail: abernad@cnb.csic.es

<sup>3</sup>Co-senior authors.

**Abbreviations:** BMI1, B lymphoma Mo-MLV insertion region 1; CSCs/CPCs, cardiac stem/progenitor cells; GFP, green fluorescent protein; MEFs, mouse embryonic fibroblast; miR-300, microRNA miR-300; MSCs, mesenchymal stem cells; Nkx2.5, NK2 homeobox 5; Oct4, POU class 5 homeobox 1; Tbx5, T-box 5; YFP, yellow fluorescent protein

Received 30.3.15; revised 11.7.15; accepted 23.7.15; Edited by G Raschella



reduced clonogenic and proliferative potential and cell-cycle arrest.<sup>18</sup> Finally, Lin28a, a highly conserved RNA-binding protein expressed during embryogenesis, plays important roles in development, pluripotency, and metabolism (reviewed in Shyh-Chang *et al.*<sup>19</sup>), and its expression in several adult injury models improves repair processes in a manner mediated by its inhibition of let-7 miRNA biogenesis.<sup>19</sup> Regarding the involvement of miRNAs in *Bmi1* regulation, there are multiple descriptions of miRNAs targeting *Bmi1* and many of them impact the corresponding stem or cancer stem cell function (Supplementary Table S1).

Adult resident cardiac stem/progenitor cells (CSCs/CPCs) are implicated in homeostatic turnover of the adult heart (reviewed in Malliaras *et al.*<sup>20</sup>). Among the different populations of putative CSCs isolated to date (reviewed in Martin-Puig *et al.*<sup>21</sup> Urbanek *et al.*<sup>22</sup> and Li *et al.*<sup>23</sup>), those expressing surface markers such as c-kit, SCA1, ATP-binding cassette *Abcg2*, or *PDGFRa* are the principal candidates. Indeed, resident CPCs with genetic elimination of *Sca1* do not properly respond to pathological damage *in vivo* and show impaired growth and survival *in vitro*.<sup>24</sup> In another study, Ellison *et al.*<sup>25</sup> have proposed that cKIT+ CSCs are necessary and sufficient for adult heart turnover, although a recent lineage-tracing experiment questioned the relevance of cKIT+ CSCs to *in vivo* cardiomyocyte turnover.<sup>26</sup> These authors claimed that, in all probability, diversity in CSC populations could be related to some heterogeneity within the CSC compartment.<sup>25</sup> Nevertheless, two clinical evaluations have been initiated with promising results in early phases.<sup>27,28</sup>

Here, using murine CPCs, we attempted to identify miRNAs that could be directly regulated by *Bmi1*. We hypothesized that those miRNAs upregulated in parallel with *Bmi1* could be involved in the maintenance of the undifferentiated state. Conversely, miRNAs downregulated with *Bmi1* might be involved in early commitment/differentiation decisions. We show that miR-300 is positively regulated in parallel with *Bmi1* expression in CPCs, while miR-188 and miR-362 are inversely regulated. Furthermore, we confirm that miR-300 is a target of *Bmi1* and show that forced expression of miR-300 favors the undifferentiated state and impedes differentiation of CPCs. Indeed, CPCs engineered to overexpress miR-300 exhibit compromised spontaneous endothelial differentiation and show a poor response to cardiomyogenic stimuli, an outcome that is possibly mediated by severe inhibition of Nkx2.5 expression.

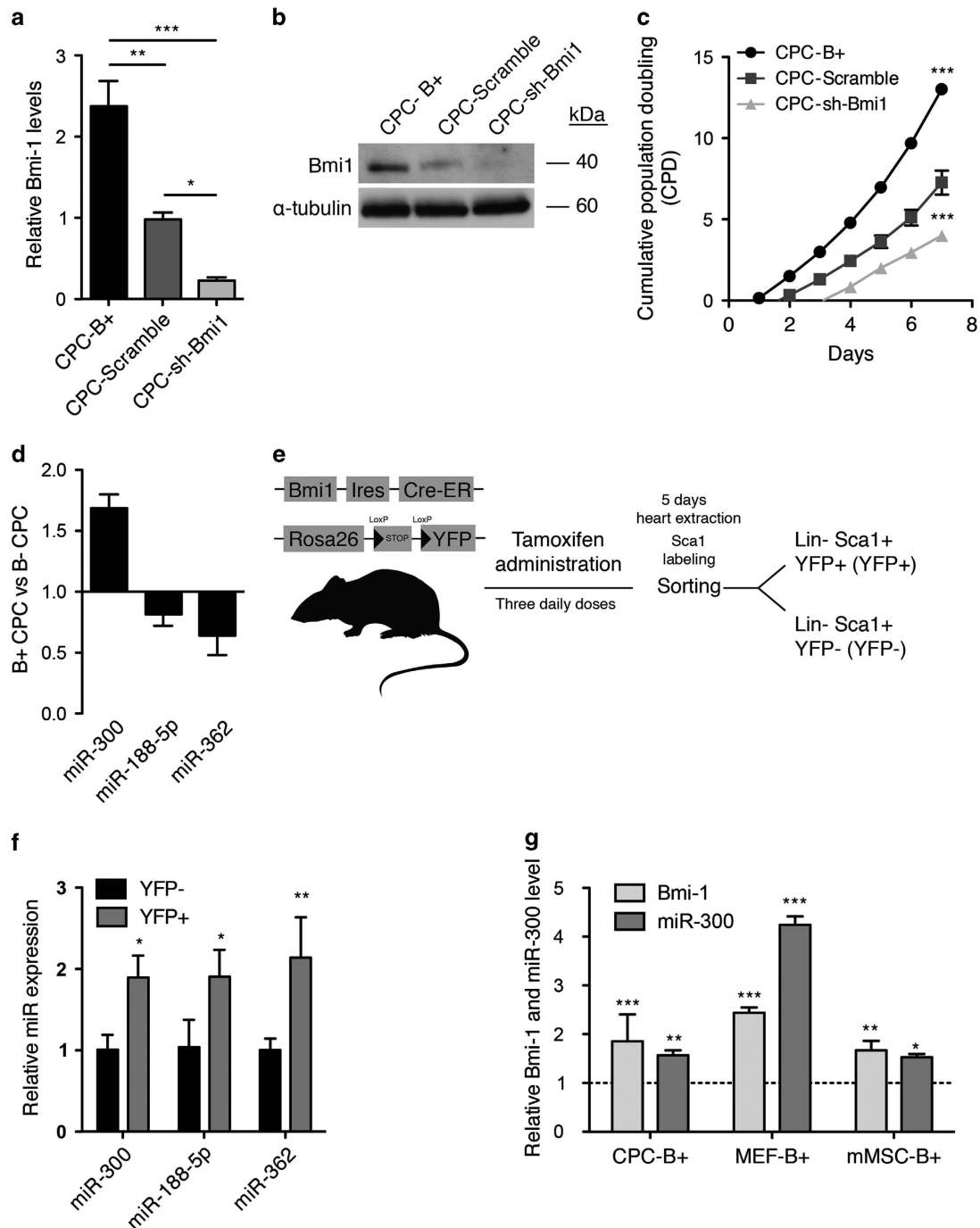
## Results

**Bmi1 regulates miR-300 expression in CPCs.** Freshly isolated Lin-SCA1+ CPCs (SCA1-CPCs) from heart are defined as *Cd45* negative and express a panel of multipotency-related genes, including *Tbx5*, *Klf4*, *c-Myc*, *Bmi1*, and *Meg3*, and a distinctive profile of endothelial, fibroblast, and cardiac markers (Supplementary Figure S1). To assess the potential involvement of *Bmi1* in the control of miRNA expression in SCA1-CPCs (hereafter named CPCs), we transduced freshly isolated CPCs with lentiviral vectors (Supplementary Figure S2a) engineered to overexpress or silence *Bmi1* (B+ and sh-Bmi1, respectively). We first

confirmed *Bmi1* up- or downregulation in transduced cells by RT-qPCR and western blotting (Figures 1a and b). As expected, CPC-B+ cells grew significantly faster than equivalent cells expressing an shRNA against *Bmi1* or a scrambled shRNA control (Figure 1c). We then compared the respective miRNA expression profiles (Microarray v1.0) of B+ and sh-Bmi1 CPCs as described,<sup>29</sup> and considered miRNAs that showed a significant upregulation in B+ CPCs and a reduction in sh-Bmi1 CPCs. From these results (GSE66813), we compiled a short list of candidate miRNAs showing *Bmi1*-dependent changes in expression (Supplementary Figure S3a). The expression profile of three miRNAs, miR-300, miR-188, and miR-362, was validated by RT-qPCR, but miR-346 was not confirmed (Figure 1d). The expression profile of the three confirmed miRNAs in CPCs corresponded to miR-362 > miR-188 > miR-300 (Supplementary Figure S3b). We next evaluated endogenous expression of these miRNAs in CPCs with moderate-high expression of *Bmi1*. To obtain this population, we marked *Bmi1*-expressing cells in the mouse and traced their descendants using an inducible *Bmi1 CreERT2* strain<sup>30</sup> crossed to a Rosa26-floxed yellow fluorescent protein (YFP) reporter line. Induction of Cre recombination by tamoxifen results in permanent expression of YFP in *Bmi1*-expressing cells and their progeny (Figure 1e). Subsequently, we compared CPC-B+ cells labeled by YFP (YFP+) with the remaining CPC compartment (YFP-). Results confirmed an upregulation of miR-300 in the YFP+ (CPC-B+) population, but not miR-188 or miR-362, which were not overrepresented in the YFP- population (Figure 1f). We validated this result in other cell lines. Accordingly, overexpression of *Bmi1* in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and adipose tissue-derived MSCs induced the upregulation of miR-300 relative to control cells (GFP), although the relative increase was cell-type dependent (Figure 1g). Specifically, *Bmi1*-induced upregulation of miR-300 in CPCs (1.35-fold) was found to be similar to MSCs (1.5-fold), but lower than that observed in MEFs (4.3-fold). Taken together, these results suggest that *Bmi1* might directly or indirectly regulate miR-300 expression.

## miR-300 counteracts CPC replicative senescence.

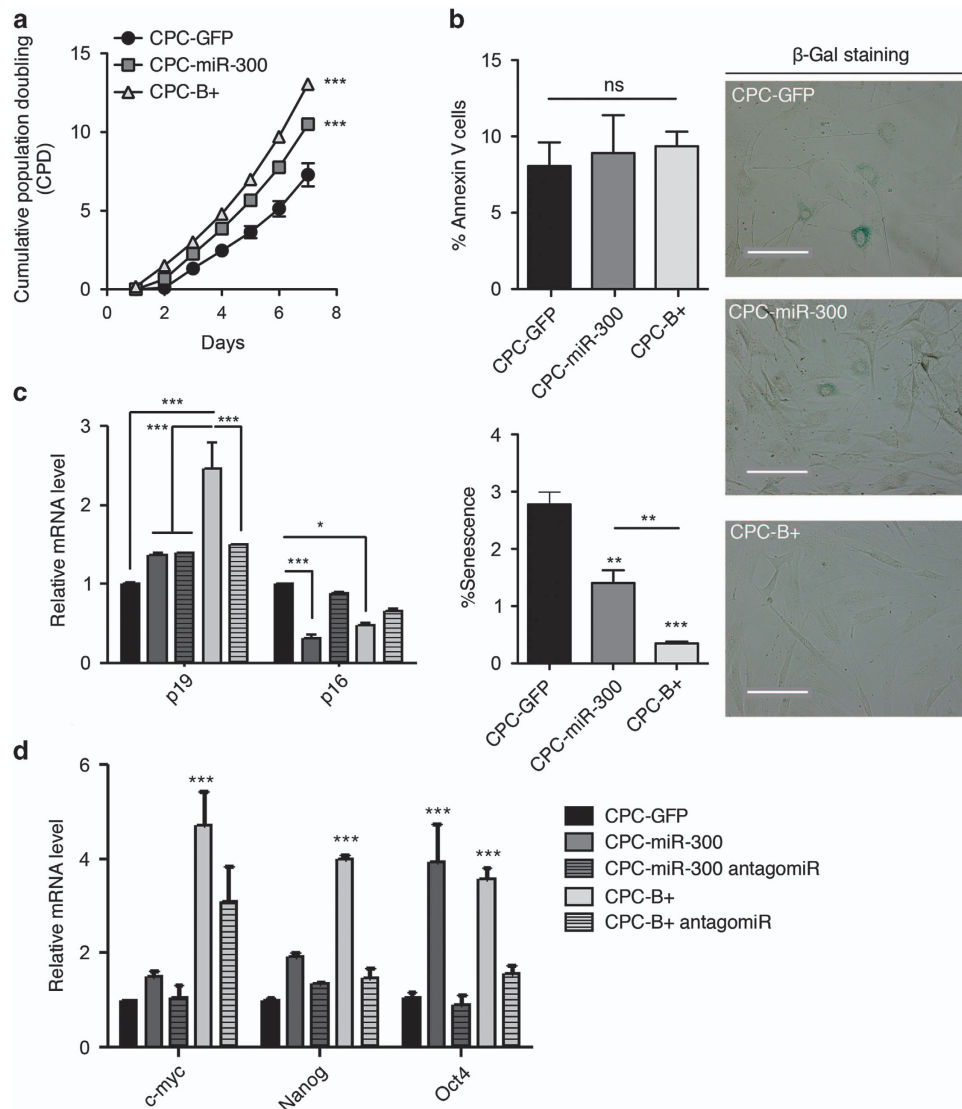
Because *Bmi1* upregulation increased cellular proliferation, we questioned whether this was mediated by miR-300. We therefore overexpressed miR-300 in CPCs using a non-viral piggyBac vector (Supplementary Figure S2b). CPC-miR-300 cells exhibited a ~5-fold increase in miR-300 compared with control (CPC-GFP) cells, whereas CPC-B+ cells had a ~1.7-fold increase (Supplementary Figure S3c). Growth rates of CPC-miR-300 and CPC-B+ cells, at all points analyzed, were significantly higher than CPC-GFP cells (Figure 2a). This increase in growth was not the result of changes in apoptosis since annexin V staining was equivalent in the three groups (Figure 2b, top left); however, significant differences were found in the proportion of senescent cells measured by  $\beta$ -galactosidase activity (Figure 2b, right panels). Accordingly, the number of  $\beta$ -Gal+ cells was reduced 2.2-fold in CPC-miR-300 and 6-fold in CPC-B+ populations compared with control (Figure 2b, bottom left), suggesting that miR-300 overexpression contributes to reduce and/or delay senescence. Consistent with a modification in senescence



**Figure 1** miR-300 expression is increased in Bmi1-overexpressing cells. CPCs were transduced with lentiviral vectors expressing Bmi1, sh-Scramble (encoding a negative control shRNA), and sh-Bmi1. Transduced cells were purified by FACS. Bmi1 expression was assessed in purified cells by (a) RT-qPCR and (b) western blot. (c) Cumulative population doubling (CPD) was estimated in CPC-B+ (closed circles), CPC-Scramble (gray squares), and CPC-sh-Bmi1 (triangles) cells. (d) RT-qPCR validation of the array results for miR-300, miR-188, and miR-362; miR-346 was not validated. (e) Isolation of an identified primary subpopulation of Sca1-CPCs characterized by moderate-high expression of Bmi1 using conditional Bmi1-YFP mice. (f) Comparison of miRNA expression in Sca1 compartments (YFP+ versus YFP-). (g) Relative expression of miR-300 in correlation with Bmi1 expression in cardiac progenitor cells (CPCs), mouse embryonic fibroblasts (MEFs), and mesenchymal stem cells (MSCs). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ )

development, differences were found in cell-cycle distribution in miR-300-expressing cells (Supplementary Figure S4). Gene expression analysis of cell-cycle senescence-associated and stemness markers in CPC-miR-300 and CPC-B+ cells demonstrated a significant upregulation in *p19*,

*c-myc*, *Nanog*, and *Oct4* levels and a clear reduction in *p16* levels (Figures 2c and d). To further examine whether miR-300 is a relevant downstream effector of Bmi1, we knocked down miR-300 expression in CPC-miR-300 and CPC-B+ cells using anti-miR-300 oligonucleotides. We titrated



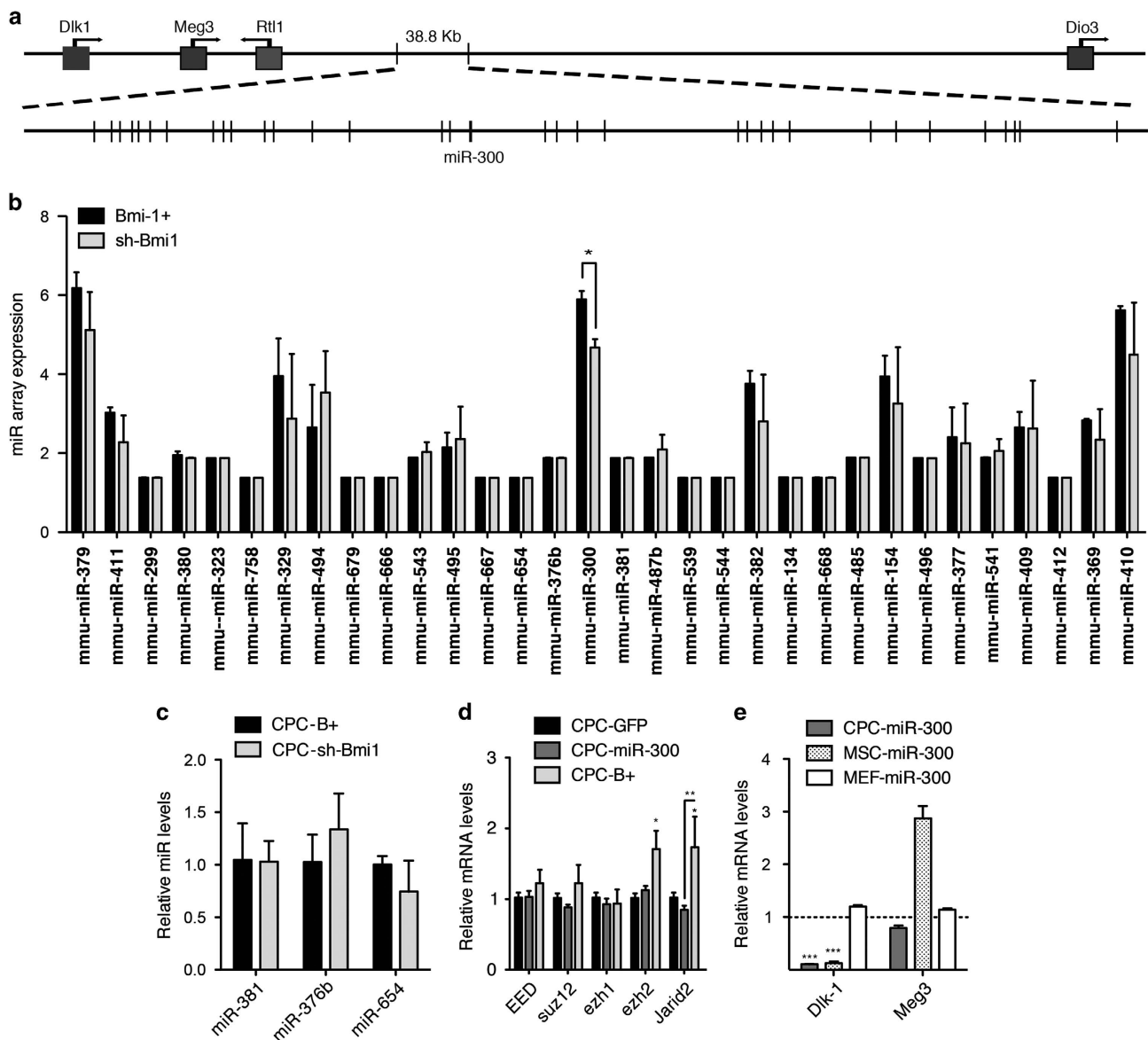
**Figure 2** miR-300 delays CPC senescence. (a) Cumulative population doubling over several culture passages of CPC-GFP (closed circles), CPC-miR-300 (gray squares), and CPC-Bmi1(B+; triangles). (b) Apoptosis and senescence determined by annexin V staining (left upper panel) and  $\beta$ -gal staining (left lower panel), respectively; the right panels show representative  $\beta$ -gal staining images. Bars, 100  $\mu$ m. (c, d) Panels of relative expression levels of *p19* and *p16* (c) and multipotency-related genes (d) in CPC-manipulated cells; where indicated, cells were transfected with mirVana miR-300 inhibitor. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ ; ns, not significant (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ )

the anti-miR concentration required to achieve at least a 50% reduction of miR-300 expression in both cell lines (Supplementary Figure S5). Results showed that anti-miR-300 (50 pmol) suppressed the *Bmi1*-mediated effect on several target genes (Figures 2c and d). In particular, BMI1-induced *Oct4* expression was fully dependent on miR-300. Thus, knockdown of miR-300 in CPC-B+ and CPC-miR-300 cells reduced *Oct4* expression to basal levels compared with control cells. Furthermore, miR-300 overexpression induced an upregulation of *Oct4* mRNA to levels similar to those in CPC-B+ cells (Figures 2c and d). Collectively, these results suggest that miR-300 is necessary for *Bmi1*-dependent expression of genes involved in cell-cycle dynamics, which might preserve CPCs in a more undifferentiated state. Indeed, genes related to multipotency and stemness were

found to be overrepresented in CPC-B+ and CPC-miR-300 cells (Figures 2c and d), and recovered to normal levels when miR-300 was downregulated. In summary, miR-300 enhances the expression of a panel of multipotent genes, indicating a plausible association with the maintenance of CPCs in a more undifferentiated state.

**miR-300 in the *Dlk1-Dio3* context.** In humans, miR-300 localizes to a dense miRNA cluster residing in chromosome 14, region 14q32.31 (*DLK1-MEG3*; Figure 3a). In the mouse, this region corresponds to the *Dlk1/Gtl2* domain located on chromosome 12qF1.<sup>31</sup> Detailed miRNA array expression analysis of the whole miRNA-encoding locus in CPC-B+ and CPC-sh-Bmi1 cells showed that miR-300 was the only miRNA significantly modulated by overexpression of





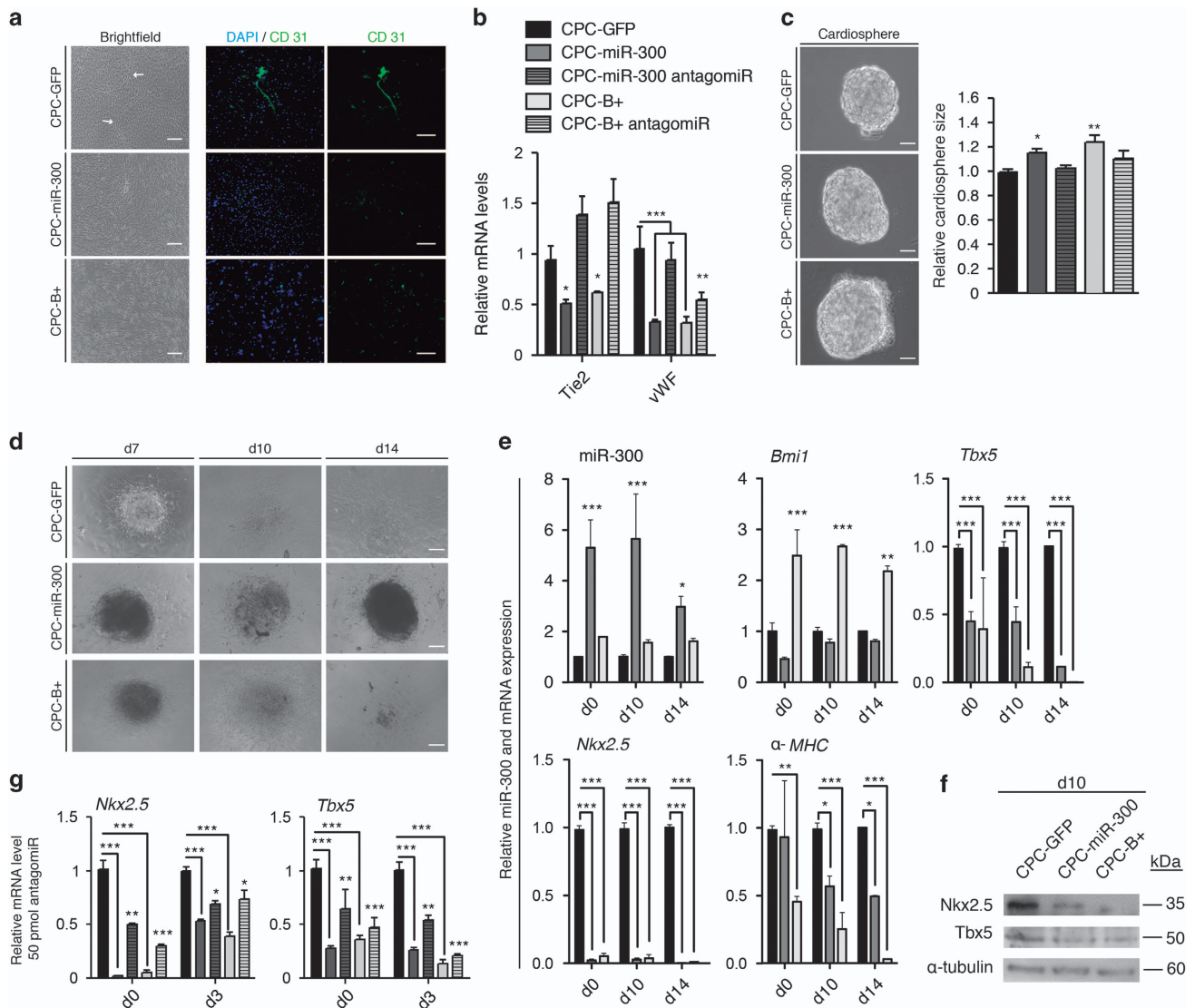
**Figure 3** miR-300 belongs to the imprinted *Dlk1-Dio3* cluster. (a) Simplified map (5' → 3') of the mouse *DLK1-DIO3* cluster (chromosome 12qF1); miR-300 is shown. (b) miR array results at the *DLK1-DIO3* cluster. (c) Direct validation by RT-qPCR of miR-300 neighbors, miR-381, miR-376b, and miR-654, confirmed the specificity of association of Bmi1 and increased expression of miR-300. (d) RT-qPCR analysis of different polycomb repressor complex 1/2 members and recruiters in CPC-GFP, CPC-B+, and CPC-miR-300 cells. (e) RT-qPCR analysis of different *DLK1-DIO3* cluster inducers in CPC-miR-300, MEF-miR-300, and MSC-miR-300 cells relative to their respective control (– GFP) cultures. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ )

Bmi1 (Figure 3b). This was confirmed by RT-qPCR analysis of neighboring miRNAs (Figure 3c). Because *DLK1-MEG3* regulation is dependent on polycomb-containing complexes,<sup>28</sup> we assessed whether miR-300 could modulate members of the polycomb complexes PRC1 and PRC2. We found a modest decrease in the expression of *Suz12*, *Ezh1*, and *Jarid2* in CPC-miR-300 cells relative to CPC-GFP cultures (Figure 3d). In contrast, CPC-B+ cells displayed a different expression pattern, with a moderate increase in *Eed* and *Suz12* expression and a significant upregulation of *Ezh2* and *Jarid2* (Figure 3d). Additionally, we found that modulation of miR-300 expression also affected other elements of the *DLK1-MEG3* domain in different cell types (Figure 3e), which was contingent on Bmi1 regulation (Supplementary Figure S6).

Accordingly, miR-300 overexpression provoked a decrease in *Dlk1* mRNA levels in CPCs and MSCs, but not in MEFs (Figure 3e), suggesting a context-dependent regulation. This effect was also observed for *Meg3*, which was reduced by miR-300 overexpression in CPCs, but was increased in MSCs (Figure 3e). Collectively, these data illustrate the great complexity of the regulatory mechanisms underlying gene expression at this locus (reviewed in Royo and Cavaille<sup>32</sup>), but also highlight the apparent selectivity of Bmi1 for miR-300 expression and the consequent impact on some elements of the *DLK1-MEG3* domain.

#### Forced expression of miR-300 impairs CPC differentiation.

To test the role of miR-300 in CPC differentiation, cells were



**Figure 4** miR-300 diminishes CPC differentiation potential in cardiospheres. **(a)** Representative images of spontaneous endothelial differentiation in transduced cells after 10–12 days of differentiation. Arrows indicate tubular structures in brightfield, which were positive for CD31. Bars, 200  $\mu$ m. **(b)** RT-qPCR analysis of endothelial genes (*Tie2* and *vWf*) in CPC-GFP (black bars), CPC-miR-300 (gray bars), and CPC-B+ (white bars) cells. **(c)** Representative cardiosphere images at day 6 of differentiation. Bars, 100  $\mu$ m (left). Relative cardiosphere size (right). **(d)** Cardiac differentiation induced by retinoic acid; representative images of transfected CPCs at day (d)7, d10, and d14 of the differentiation protocol. Bars, 200  $\mu$ m. **(e)** Selected cardiac genes were measured by RT-qPCR in transfected cells during differentiation (d0, d10, and d14). **(f)** Western blotting of total protein extracts was performed at d10. **(g)** RT-qPCR analysis of selected cardiac genes in CPCs transfected with miR-Vana miR-300 inhibitor. \*\*\* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.05 (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n$  = 6)

first allowed to spontaneously differentiate in culture and endothelial commitment was measured. CPC-GFP cells, but not CPC-miR-300 or CPC-B+ cells, formed reticular structures after 10–12 days (Figure 4a, brightfield), which were positive for CD31 (Figure 4a). Moreover, mRNA analysis of endothelial markers revealed that *Tie2* and *vWf* expression was significantly reduced in CPC-miR-300 and CPC-B+ cells compared with control CPC-GFP cells (Figure 4b). These data suggest a functional impairment of endothelial cell differentiation in miR-300 and *Bmi1*-expressing cells. To test the generality of this response, we used the same cell populations and induced cardiac differentiation by the hanging drop method. After 6 days in culture, cardiospheres from CPC-miR-300 and CPC-B+ cells were significantly

larger than those formed from CPC-GFP cells (Figure 4c), corroborating the finding of increased proliferation potential (Figure 2a). Additionally, knockdown of miR-300 in CPC-miR-300 cells led to a significant reduction in cardiosphere size (Figure 4c, right panel). Following retinoic acid treatment to promote cardiac differentiation, plated CPC-B+ cardiospheres presented an apparently slower differentiation kinetic as observed by a reduction in cell spreading compared with control cells. Also, CPC-miR-300 cardiospheres continued to proliferate with minimal differentiation compared with CPC-GFP control cells, which showed greater expansion (Figure 4d). Time course analysis of cardiac marker gene expression revealed that, compared with control cells, levels of  $\alpha$ -MHC, *Nkx2.5*, and *Tbx5* were significantly reduced in

CPC-B+ and CPC-miR-300 cells throughout the differentiation period (Figure 4e). Indeed, at d14 of differentiation,  $\alpha$ -MHC gene expression was almost abolished in CPC-B+. Of note, *Nkx2.5* gene expression was scarcely detected at any period in CPC-B+ and CPC-miR-300 (Figure 4e), and this was confirmed by western blot analysis (Figure 4f). Because *Nkx2.5* is a critical cardiogenic transcription factor,<sup>30</sup> its evident absence in these cells likely contributes to the impaired cardiogenic differentiation observed. Finally, to confirm that miR-300 is a downstream effector of *Bmi1* during the early steps of CPC cardiogenic differentiation, we analyzed *Nkx2.5* and *Tbx5* expression early after anti-miR-300 transfection. Exposure to anti-miR-300 for as little as 3 days resulted in a partial rescue of *Nkx2.5* and *Tbx5* expression in CPC-B+ and CPC-miR-300 cells compared with control cells (Figure 4g).

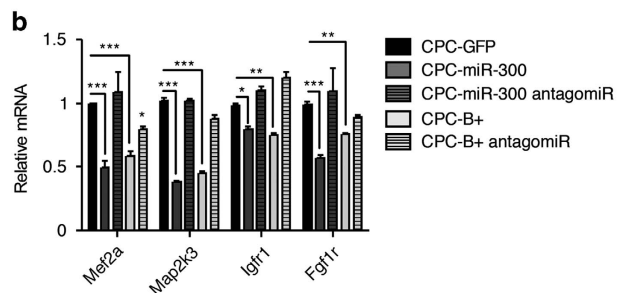
**miR-300/*Bmi1* interaction network in CPC.** Little is known about the physiological roles of miR-300. We compared all potential miR-300 target genes predicted by specialized databases and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was used to link the direct targets. The most significant targets found by IPA are shown in Figure 5. These included genes in the *Tgf- $\beta$*  signaling pathways (*Map2k3*) and factors involved in vertebrate cardiogenesis (*Smad2*, *Mapk14*, *Bmpr1a*) (Figure 5a). The *Tgf- $\beta$*  pathway is associated with the regulation of cardiac differentiation.<sup>33</sup> Another target, *Map2k3*, of the *Fgf* signaling pathway has been also described to be important in cardiac differentiation<sup>34</sup> and affects mainly the *p38 Mapk* pathway.<sup>35,36</sup> Eleven putative targets were selected for validation (Figure 5b and Supplementary Figure S6). RT-qPCR analysis revealed that *Mef2a*, *Map2k3*, *Igfr1*, and *Fgf1r* expression was dependent on miR-300 expression, and this decrease in expression could be reversed by transfection of an anti-miR-300 (five shown in bold in Figure 5a). A similar modulation was found in CPC-B+ cells (Figure 5b). Expression of the remaining putative miR-300 targets tested was not influenced by miR-300, although all were inhibited by *Bmi1* overexpression (Supplementary Figure S6). The finding of *Bmi1* as a highly probable target of miR-300 suggests that it could directly regulate *Bmi1*.

Because activation of *Bmi1* in CPCs results in increased levels of miR-300 (Figure 1), we tested whether miR-300 activation affected the levels of *Bmi1* mRNA and protein. We examined *Bmi1* expression in CPC-B+ and CPC-miR-300 cells before and after transfection with anti-miR-300. Both cell lines exhibited an increase in *Bmi1* expression following suppression of miR-300 expression (Figures 6a and b). These data suggest that *Bmi1* positively regulates miR-300 and, reciprocally, miR-300 negatively regulates *Bmi1* expression in a negative feedback loop.

Taken together, our study provides evidence that miR-300 could play an important role in maintaining multipotent cell status, favouring Oct4 transcription factor expression, and negatively regulating differentiation. Since none of the confirmed genes modulated by overexpression of miR-300 or *Bmi1* (*Oct4*, *Nkx2.5*, *Tbx5*, and *vWF*) are predicted as direct targets (Figure 5), our results suggest a non-direct effect.

**a**  
Main miR-300 predicted targets

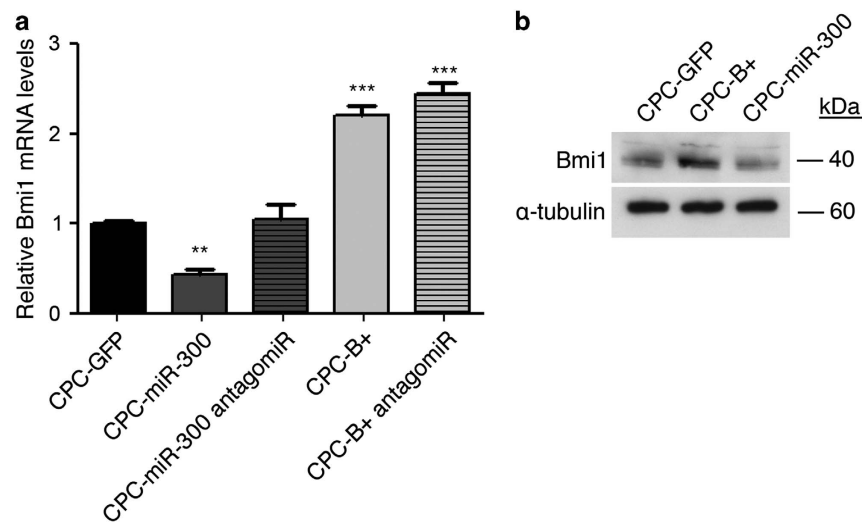
Gene Symbol	Gene Name	SUM
* <i>Egr1</i>	early growth response 1	6
<i>Phf6</i>	PHD finger protein 6	6
<i>Rarb</i>	retinoic acid receptor, beta	6
* <i>Bmi1</i>	<b><i>BMI1 polycomb ring finger oncogene</i></b>	5
<i>Fzd4</i>	frizzled homolog 4	5
* <i>Map2k3</i>	<b><i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i></b>	5
<i>Mapk1</i>	mitogen-activated protein kinase 1	5
<i>MTF1</i>	Metal-regulatory transcription factor 1	5
<i>Pak3</i>	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3	5
<i>Aebp2</i>	AE binding protein 2	4
* <i>Bmpr1a</i>	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	4
<i>Bmpr1b</i>	bone morphogenetic protein receptor, type 1B	4
<i>Fgf12</i>	fibroblast growth factor 12	4
<i>Fzd5</i>	frizzled homolog 5	4
* <i>Igf1r</i>	<b><i>insulin-like growth factor 1 receptor</i></b>	4
* <i>Fgfr1</i>	<b><i>fibroblast growth factor receptor 1</i></b>	4
<i>Jmjd1a</i>	lysine (K)-specific demethylase 3A	4
<i>Kras</i>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog 4	4
* <i>Mapk14</i>	mitogen-activated protein kinase 14	4
* <i>Mef2a</i>	<b><i>myocyte enhancer factor 2A</i></b>	4
<i>Phf17</i>	PHD finger protein 17	4
<i>Phf20</i>	PHD finger protein 20	4
* <i>Smad1</i>	SMAD family member 1	4
<i>Smad2</i>	SMAD family member 2	4
* <i>Smad4</i>	SMAD family member 4	4
* <i>Smad5</i>	SMAD family member 5	4



**Figure 5** miR-300 regulatory potential. (a) Main plausible targets of miR-300 were identified by comparing all predicted miRNA target sites in miRWalk database produced by Diana, Pictar4, miRanda, Pita, TargetScan, and RNA22 databases, containing all the putative targets. Main miR-300 predicted targets with at least four hits in these databases (indicated in the table) were selected. Asterisks indicate tested targets (11 in total) and in bold-italic those validated targets. (b) RT-qPCR analysis of CPC; where indicated, cells were transfected with mirVana miR-300 inhibitor. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ )

## Discussion

*Bmi1* is required for the self-renewal of adult stem cells in many tissues.<sup>3,6,30,37–39</sup> Because *Bmi1* knockdown reduces proliferation of mouse CPCs (Figure 1), we attempted to identify regulatory elements controlled by *Bmi1*. We used lentiviral vectors to overexpress (B+) or inhibit (sh) *Bmi1*, to study its function in CPCs. CPC-B+ cells had an enhanced proliferation capacity relative to CPC-sh-*Bmi1* cells, suggesting that *Bmi1* is important for the maintenance of some CPC primitive properties. Because miRNAs can fine tune cell homeostasis,<sup>16,17</sup> we screened for miRNAs regulated by *Bmi1*. To the best of our knowledge, all miRNAs identified in association with *Bmi1* expression are inhibitors (Supplementary Table S1). Therefore, we searched for miRNAs that could be regulated by *Bmi1* in CPCs, as plausible modulators of stem cell function.



**Figure 6** Bmi1/miR-300 negative feedback loop. (a) RT-qPCR analysis of Bmi1 expression in CPC-GFP, CPC-miR-300, and CPC-B+ cells, before and after treatment with the antagomiR. (b) Bmi1 protein levels measured by western blot;  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ )

We confirmed that miR-300 is upregulated when *Bmi1* levels are high. Also, miR-300 is highly expressed in a primary subpopulation of CPCs characterized by medium-high expression of *Bmi1*. Presumably, because of the comparatively low basal expression of miR-300 (Supplementary Figure S3b), it was not included in a recently published study on the miRNA repertoire of adult mouse CPCs.<sup>40</sup> Expression of *Bmi1* in other murine cell lineages (MEFs and MSCs) consistently activated miR-300 expression, although the levels of overexpression were variable. All these results suggest that *Bmi1* regulates miR-300. BMI1 is known as a transcriptional repressor.<sup>7</sup> To upregulate *c-myc* mRNA, *Bmi1* activates the Wnt pathway by repressing the Dickkopf (*Dkk*) family of Wnt inhibitors. Repression of *Dkk* genes by *Bmi1*, in particular *Dkk1*, drives the upregulation of Wnt and finally the Wnt target gene, *c-myc*.<sup>11</sup> We hypothesize that a similar mechanism of suppression of a transcriptional repressor may operate to activate miR-300 when *Bmi1* is overrepresented.

*Bmi1* plays a central role in senescence and aging, regulating the expression of relevant genes involved in aging and cancer.<sup>41–43</sup> Overexpression of *Bmi1* results in repression of the tumor suppressor *p16INK4a*, which has emerged as a major regulator of aging and age-associated pathologies.<sup>44</sup> We show that in CPCs, *Bmi1*, and miR-300 oppositely regulate expression of *p16INK4a* and *p19ARF*. Expression of *p16INK4a* is decreased in CPCs upon *Bmi1* and miR-300 upregulation (Figure 2c); in contrast, *p19ARF* levels are upregulated. These two genes are localized in the same locus, sharing the common exons 2 and 3, but differing in their first exons and their respective promoters. As neither *p16INK4a* or *p19ARF* are miR-300 targets, the present evidence suggests that the observed changes to *p16INK4a* and *p19ARF* expression are due mainly to changes in the transcriptional activity of their respective promoters. This effect on the *INK4a/ARF* locus has been also observed in cells treated with histone deacetylase inhibitors, with consequences for chromatin remodeling.<sup>45</sup> It is possible that variations in BMI1 protein levels could affect

PRC1 complex activity and chromatin structure; such changes seem to alter *INK4a/ARF* transcription in a way similar to histone deacetylase inhibitors. We hypothesize that the DLK1-MEG3 cluster, where miR-300 is localized, could be regulated in a similar manner.

It has previously been demonstrated that *p16INK4a* accumulates in conjunction with p38 activation in ras-induced senescent cells, and that this accumulation is essential for senescence.<sup>35</sup> Although prevention of senescence in CPC-miR-300 cells is less effective than in CPC-B+, *p16* levels are significantly reduced in CPC-miR-300 cells. This could be related to the different levels of overexpression of miR-300 in the cell populations (Supplementary Figure S3c). Thus, it is possible that miR-300 upregulation may at least partially account for the downregulation of *p16INK4a* and the p38 pathway, thereby bypassing cell senescence. Since the most important known senescence-relevant target of *Bmi1* is *p16INK4a*, reduction of senescence in CPCs by miR-300 is almost certainly associated with reduction of *p16INK4a* expression. In agreement with this, CPC-miR-300 cells increase the expression levels of *Oct4*. Additionally, it has been recently shown that the *Oct4/p16INK4a* ratio directly correlates with culture life span. This result suggests that low *p16INK4a* and high *Oct4* levels govern the senescent state of MSCs and therefore may be a good predictor of *in vitro* viability.<sup>45</sup> We speculate that the same principle operates in CPCs.

Forced expression of miR-300 reduced spontaneous endothelial differentiation of CPCs, and a similar effect was obtained after *Bmi1* overexpression. Cardiac differentiation induced by retinoic acid was also reduced in CPC-miR-300 cells. These cells generated similar cardiosphere-type bodies to control cells (d0–d8), but did not differentiate further. This blockage seemed to be even stronger than that observed in CPC-B+ cells. From a panel of critical cardiogenic genes analyzed, the significant reduction found in the expression of *Nkx2.5* would be sufficient to explain the phenotype



observed.<sup>46</sup> Because *Nkx2.5* is not a plausible direct target for miR-300 (Figure 5), we infer that this effect is indirect.

In conclusion, miR-300 is a new member of the family of genes that control stem cell function regulated by *Bmi1* in multipotent CSCs. miR-300 favors maintenance of the undifferentiated state, inhibits differentiation, and establishes a negative feedback loop to control levels of *Bmi1*.

## Materials and Methods

**Animals.** C57BL/6 mice (8–12 weeks old) were provided by Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Where indicated, *Bmi1*<sup>CreER/+</sup>; *Rosa26*<sup>YFP/+</sup> (*Bmi1*-YFP) mice were generated by crossing *Bmi1*<sup>CreER/+</sup> mice<sup>27</sup> with *Rosa26*<sup>YFP/+</sup> reporter mice (Valiente-Alendi *et al.* in press). *Bmi1*<sup>CreER/+</sup>; *Rosa26*<sup>YFP/+</sup> double heterozygous male and female mice were injected intraperitoneally with tamoxifen (TM; Sigma; 9 mg per 40 g of body weight), every 24 h on three consecutive days between postnatal days 30 (P30) and P60. Animals were maintained and handled according to the recommendations of the CNIC Institutional Ethics Committee.

**Lentiviral construction and non-viral vectors.** Lentivirus production and titration were carried out as described.<sup>47</sup> Viral supernatant stocks contained  $1 \times 10^7$  TU/ml, with a 1:100 TU/physical particles ratio as measured by qPCR. Cells were transduced with cleared supernatants at a multiplicity of infection of 10, in 3 ml of culture medium and polybrene (Sigma) at 8  $\mu$ g/ml, for 8 h. Then, inoculum was removed and cell cultures were refreshed with medium before assay.

**Cellular transfection.** Non-viral piggy-bac vectors (1–2  $\mu$ g) were co-transfected with mouse transposase-expression vector (0.5  $\mu$ g) in SCA1+ cells, MEFs, and MSCs, using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (11668-027, Sigma). MirVana miRNA inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was used to knockdown *mir-300* expression in a separate set of experiments. Transfection studies, in parallel with negative control miRNA inhibitor experiments, were carried out with lipofectamine RNAiMax Transfection Reagent (13778030-Sigma).

**Isolation of SCA1+ and *Bmi1*+ CPC cells from adult heart and cell culture.** SCA1+ CPCs were isolated essentially as previously described.<sup>48</sup> Enrichment for SCA1+ cells was achieved by incubating cells with a SCA1-biotinylated rat antibody (ab25196; Abcam, Cambridge, UK) and anti-rat kappa microbeads (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain; 130-047-401), followed by purification with magnetic selection. Purified cells were plated in culture plates precoated with 0.1% gelatin and were maintained at 37 °C, 3% oxygen with the corresponding medium (IMDM, 10% FCS, 1% penicillin and streptomycin, and 1% L-glutamine, supplemented with 10 ng/ml EGF (E9644, Sigma), 20 ng/ml FGF (450-33, Pretech, London, UK), and LIF (10<sup>3</sup> U; ESG1107, Millipore, Madrid, Spain). Medium was refreshed every 2 days. Cells were passaged at 70–80% confluency by trypsinization.

*Bmi1*+ CPC cells were obtained from hearts of *Bmi1*-YFP mice 5 days after TM induction. Hearts were perfused and processed as above. The resulting single-cell suspension was passed through a 40  $\mu$ m filter to remove debris. YFP+ cells were separated from the total heart mass with a BD FACS Aria II Special Order System cell sorter fitted with a 488 nm laser to excite YFP (collected in the 525/550 channel). To discriminate YFP+ cells from autofluorescent cells, a 488 nm laser was used to excite cells, followed by collection in the 585 channel (phycoerythrin). Purified YFP+ cells were cultured at 37 °C, 3% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in the same expansion medium used for SCA1+ cells.

**MicroRNA microarray.** After SCA1+CPC transduction of the indicated lentiviral vectors (Supplementary Figure S2a), positively transduced cells were sorted, briefly expanded, and total RNA was isolated using the mirVana kit (Ambion, Madrid, Spain). RNA was quantified and integrity was checked by agarose gel electrophoresis. The total RNA required for analysis (500 ng) was prepared in 10  $\mu$ l RNase-free water and analyzed using Agilent miRNA microarrays (Microarray v1.0). After normalization, only those probes present in at least one sample and with average expression over the 20th percentile of all average expressions were considered for further analysis (197 miRNAs). We then used linear models as implemented in the limma Bioconductor package.<sup>26</sup> We considered the experimenter as a random variable. The analysis was performed at the CNIC Bioinformatics Unit.

**Endothelial and retinoic acid-induced cardiac differentiation.** For endothelial differentiation, SCA1+ cells were cultured for 10 days in the above-indicated expansion conditions until spontaneous tubular structures appeared. For cardiac differentiation, SCA1+ cells were trypsinized and diluted to 50 000 cells/ml. Cardiospheres were prepared using hanging drop culture (20  $\mu$ l approx 1000 cells) for 3 days in DMEM GlutaMax supplemented with 20% FBS, 1% non-essential amino acids, and  $\beta$ -mercaptoethanol. Cardiospheres were harvested, washed, and cultured for three additional days on nonadherent Petri culture dishes (10 cm) in fresh medium. Cardiospheres were then subsequently treated with *all-trans* retinoic acid (10 nM) in DMEM GlutaMax supplemented with 15% FBS, 1% non-essential amino acids, and  $\beta$ -mercaptoethanol (50  $\mu$ M). The medium was replenished every 2 days.

**Apoptosis and senescence assays.** To determine programmed cell death of SCA1+ cells, cells were harvested and examined for annexin V staining (APC-conjugated; 550474, BD Pharmingen, Madrid, Spain), using an apoptosis detection kit (556570 BD Pharmingen). For detection of senescence detection, cells were cultured to a density of 20 000 cells/cm<sup>2</sup> in  $\beta$ -galactosidase staining buffer for 24 h (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Cells were then fixed and stained.

**Immunofluorescence.** For immunostaining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After washing three times in PBS – 0.1% BSA for 5 min, cells were permeabilized with 0.2% Triton (Sigma, T9284) in PBS for 20 min, and washed in PBS – 0.1% BSA. Primary antibody against CD31 (MAB1398Z, Millipore) was diluted in PBS – 0.1% BSA to 1/200 and incubated overnight at 4 °C. After washing, cells were incubated with a FITC-conjugated goat anti-hamster secondary antibody (127-095-099, Jackson, Bar Harbor, ME, USA) used at a 1/1000 dilution in the presence of DAPI for 45 min (1 h at room temperature). Vectashield mounting medium without DAPI (Vectors Lab, Burlingame, CA, USA; H-1000) was applied to all slides. Fluorescent images were taken using a Nikon A1-R inverted confocal microscope.

**Gene expression analysis and western blotting.** Total RNA was isolated from cultured cells using the Direct-zol RNA Miniprep Kit (Zymo, Irvine, CA, USA) and reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) for mRNA and with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (4366596, Applied Biosystems, Madrid, Spain) for miRNAs. Complementary DNAs were analyzed by real-time PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for mRNA and No AmpErase TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (S08590, Applied Biosystems) for miRNA. Amplification, detection, and data analysis were carried out with an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System. The crossing threshold values for individual mRNAs were normalized to *Gusb* expression for mRNAs and *U6* for miRNAs. Changes in mRNA expression were denoted as the fold change relative to the control (see supplementary Table S2 for primers used).

For western blotting, total proteins were isolated using RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) and quantified by the DC Protein assay (Bio-Rad). Approximately 50  $\mu$ g of protein was resolved on each lane on 10% SDS-PAGE gels, electrotransferred onto nitrocellulose membrane, and probed with specific antibodies (see Supplementary Table S3 for antibodies used).

**Statistics.** Data were analyzed by two-way ANOVA and Student's *t*-test. Error bars represent S.E.M. In all corresponding figures, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and ns *P* > 0.05.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This study was supported by grants from the Ministry of Science and Innovation (SAF2012-34327, PLE2009-0147, and PSE-010000-2009-3), the Comunidad Autónoma de Madrid (S2010/BMD-2420), the Instituto de Salud Carlos III (RETICS.TERCCEL), and the European Commission (Proposal 242038) to AB, (BFU2012-35258 and RYC-2009-04341) to JAB, and fellowship FPU-AP2010-5951 to FMC. We thank JL Torán and S Mendez-Ferrer for critical discussions of the manuscript; RM Carmona for help with the animal procedure; Fátima Sánchez Cabo for statistic and bioinformatic assistance, and K. McCreath for editorial support.

The CNB-CSIC and CNIC are supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The CNIC is additionally supported by the Pro-CNIC Foundation. The authors declare no competing financial interests.

- van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H *et al*. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 1994; **8**: 757–769.
- Molofsky AV, Pardoll R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; **425**: 962–967.
- Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL *et al*. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; **423**: 302–305.
- Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ *et al*. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 389–401.
- Tanaka T, Komai Y, Tokuyama Y, Yanai H, Ohe S, Okazaki K *et al*. Identification of stem cells that maintain and regenerate lingual keratinized epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 511–518.
- Zacharek SJ, Fillmore CM, Lau AN, Gludish DW, Chou A, Ho JW *et al*. Lung stem cell self-renewal relies on BMI1-dependent control of expression at imprinted loci. *Cell Stem Cell* 2011; **9**: 272–281.
- Biehls B, Hu JK, Strauli NB, Sangiorgi E, Jung H, Heber RP *et al*. BMI1 represses Ink4a/Arf and Hox genes to regulate stem cells in the rodent incisor. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 846–852.
- Allegra E, Trapasso S, Pisani D, Puzzo L. The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology* 2014; **86**: 199–205.
- Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 2012; **30**: 372–378.
- Cho JH, Dimri M, Dimri GP. A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. *J Biol Chem* 2013; **288**: 3406–3418.
- Xie X, Piao L, Cavey GS, Old M, Teknos TN, Mapp AK *et al*. Phosphorylation of Nanog is essential to regulate Bmi1 and promote tumorigenesis. *Oncogene* 2014; **33**: 2040–2052.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D *et al*. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; **138**: 592–603.
- Fazio TG, Huff JT, Panning B. An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 2008; **134**: 162–174.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C *et al*. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; **442**: 533–538.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 126–139.
- Schoettner S, Scarola M, Comisso E, Schneider C, Benetti R. An Oct4-pRb axis, controlled by MiR-335, integrates stem cell self-renewal and cell cycle control. *Stem Cells* 2013; **31**: 717–728.
- Nimmo R, Ciau-Uitz A, Ruiz-Herguido C, Soneji S, Bigas A, Patient R *et al*. MiR-142-3p controls the specification of definitive hemangioblasts during ontogeny. *Dev Cell* 2013; **26**: 237–249.
- Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, Pappa KI, Antsaklis A, Anagnostou NP *et al*. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Transl Med* 2014; **3**: 54–68.
- Shyh-Chang N, Zhu H, Yvanka de Soysa T, Shinoda G, Seligson MT, Tsanov KM *et al*. Lin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. *Cell* 2013; **155**: 778–792.
- Malliaras K, Ibrahim A, Tseliou E, Liu W, Sun B, Middleton RC *et al*. Stimulation of endogenous cardioblasts by exogenous cell therapy after myocardial infarction. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 760–777.
- Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 320–331.
- Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T *et al*. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 9226–9231.
- Li Y, Fukuda N, Yokoyama S, Kusumi Y, Hagikura K, Kawano T *et al*. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; **549**: 98–106.
- Bailey B, Fransioli J, Gude NA, Alvarez R Jr, Zhang X, Gustafsson AB *et al*. Sca-1 knockout impairs myocardial and cardiac progenitor cell function. *Circ Res* 2012; **111**: 750–760.
- Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD *et al*. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 2013; **154**: 827–842.
- van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC *et al*. c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 2014; **509**: 337–341.
- Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S *et al*. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011; **378**: 1847–1857.
- Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D *et al*. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012; **379**: 895–904.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**: Article3.
- Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008; **40**: 915–920.
- Benetatos L, Hatzimichael E, London E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I *et al*. The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**: 795–814.
- Royo H, Cavaille J. Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biol Cell* 2008; **100**: 149–166.
- Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A *et al*. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; **16**: 1558–1566.
- Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Carboni C, Beermann F, Pedrazzini T. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1724–1733.
- Fu XB, Xing F, Yang YH, Sun TZ, Guo BC. Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003; **9**: 2036–2039.
- Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C, Trappe S. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol* 2003; **547**: 977–987.
- Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7101–7106.
- Chattoo W, Abdouh M, David J, Champagne MP, Ferreira J, Rodier F *et al*. The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci* 2009; **29**: 529–542.
- Robson LG, Di Foggia V, Radunovic A, Bird K, Zhang X, Marino S. Bmi1 is expressed in postnatal myogenic satellite cells, controls their maintenance and plays an essential role in repeated muscle regeneration. *PLoS One* 2011; **6**: e27116.
- Bras-Rosario L, Matsuda A, Pinheiro AI, Gardner R, Lopes T, Amaral A *et al*. Expression profile of microRNAs regulating proliferation and differentiation in mouse adult cardiac stem cells. *PLoS One* 2013; **8**: e63041.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchikonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B *et al*. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011; **479**: 232–236.
- Matheu A, Klatt P, Serrano M. Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42433–42441.
- Bhattacharya R, Nicoloso M, Arvizo R, Wang E, Cortez A, Rossi S *et al*. MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer. *Cancer Res* 2009; **69**: 9090–9095.
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; **397**: 164–168.
- Piccinato CA, Sertie AL, Torres N, Ferretti M, Antonioli E. High OCT4 and Low p16(INK4A) Expressions determine in vitro lifespan of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2015; **2015**: 369828.
- Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pradervand S *et al*. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell* 2004; **117**: 373–386.
- Torres R, Garcia A, Paya M, Ramirez JC. Non-integrative lentivirus drives high-frequency cre-mediated cassette exchange in human cells. *PLoS One* 2011; **6**: e19794.
- Izarra A, Moscoso I, Levent E, Cañón S, Cerrada I, Díez-Juan *et al*. miR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Rep* 2014; **3**: 1029–1042.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



